



TITLE:

DNAマーカーを用いた緑茶の原料
品種識別に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

北島(氏原), ともみ

CITATION:

北島(氏原), ともみ. DNAマーカーを用いた緑茶の原料品種識別に関する研究. 京都大学, 2013, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12777>

RIGHT:

DNA マーカーを用いた緑茶の原料品種識別に関する研究

北島（氏原） ともみ

2013

目次

序論	1
第 1 章 DNA 単離法の検討	
1-1 リーフ茶からの DNA 単離	11
1-2 浸出液（緑茶飲料）からの DNA 単離	16
第 2 章 核ゲノムを用いた品種識別	
2-1 Simple sequence repeat (SSR) マーカーを用いた品種識別	
2-1a 主要な国産品種の識別	29
2-1b リーフ茶の品種識別への応用	34
2-1c 中国品種のタイピング	35
2-1d 緑茶浸出液の品種識別への応用	39
2-2 新規 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)	
マーカーの開発	43
第 3 章 葉緑体ゲノムを用いた緑茶の原産地判別	57
第 4 章 総括	68
引用文献	71
謝辞	85
発表論文	86

序論

茶は、コーヒー、ココアと並び三大嗜好飲料とされ、世界中で広く飲用されている。主要な生産国はアジア、アフリカに位置するが、近年ではオーストラリアや南アメリカ大陸にも栽培が広がっており、2009年には製茶工程を経て乾燥状態となった茶葉として 4.24×10^6 トンが生産された¹⁾。図1に2009年の生産量上位10国を示した。最も生産量が多いのは中国 (1.38×10^6 トン) で、以下インド (9.73×10^5 トン)、ケニア (3.14×10^5 トン) と続く。日本は世界で第9位 (8.60×10^4 トン) の生産量である¹⁾。

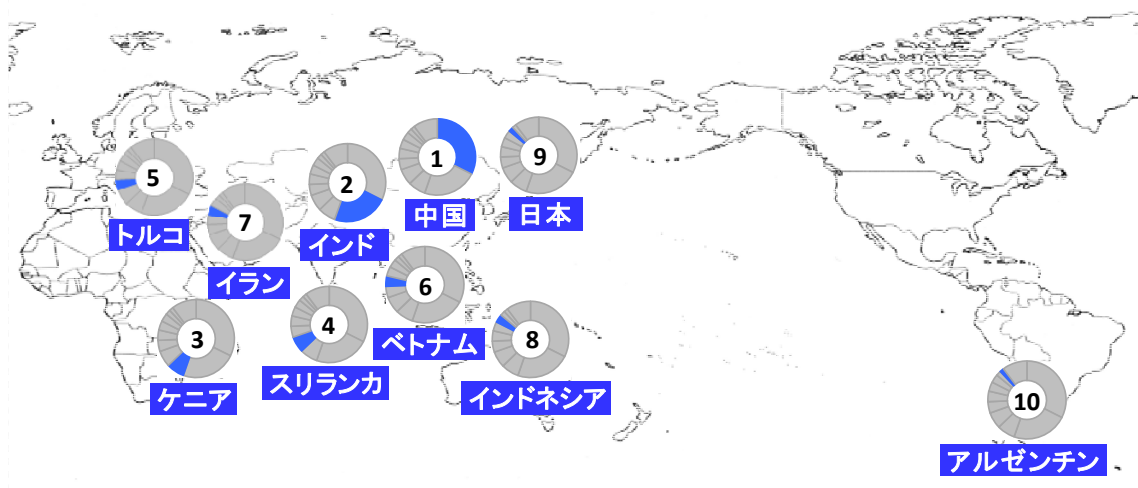


図1 2010年における茶の主要生産国と各国の生産量が全体に占める割合¹⁾
数字は順位

茶には製法の違いにより様々な茶種が存在する。大別すると、紅茶、ウーロン茶、緑茶の3種類であり、それぞれ製造工程の中で、内在酵素による酸化反応を十分に行なったもの、ある程度行なったもの、製造工程の最初に蒸すなど加熱して酵素を失活させ、反応を行わせなかったものと特徴付けることができる。世界で生産される茶のうち78%程度が紅茶、残り20%程度が緑茶、2%以下がウーロン茶であるとされるが²⁾、日本においては、生産さ

れる茶の大部分が緑茶である。栽培法や製茶法の異なる様々な緑茶が生産され（図 2）、最も一般的な煎茶にも酵素失活のための蒸し時間の長短により深蒸し茶と普通煎茶といった違いがあり、また加熱を釜で炒ることで行う釜炒り茶といった茶種がある³⁾。また生育中の新芽に菰・

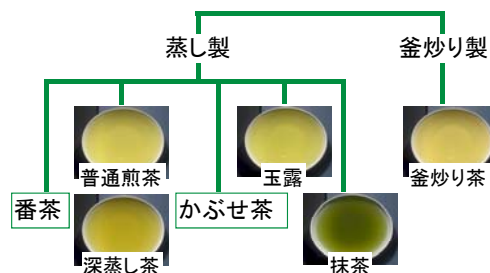


図 2 日本で生産される主要な緑茶

藁や化学繊維で被覆をし、20～30 日間ほど遮光処理（段階を追って、最終的には遮光率 98% 以上とする）して栽培した原葉を煎茶と同様に製茶した玉露や、被覆栽培した原葉を煎茶や玉露とは異なるてん茶炉で製造するてん茶、てん茶を石臼で粉末にして製造され、主として茶道に用いられる抹茶などがあり³⁾、それらは鮮やかな緑色の外観と強いうま味を有する。茶は、伝統的には急須、ティーポットなどを用いて熱水による浸出液を調製し飲用するリーフ茶の形で消費されてきたが、近年では工場で調製した浸出液を PET ボトルや缶に詰めて販売・消費するボトル詰め飲料の消費が定着し、国内においても、2010 年には緑茶、混合茶飲料を合わせて 3.13×10^9 L の飲料が生産され⁴⁾、緑茶（茶葉）消費量 8.87×10^4 トンのうち 28%にあたる 2.48×10^4 トン⁴⁾がボトル詰め飲料の原料として使用されたと推計されている（図 3）⁴⁾。

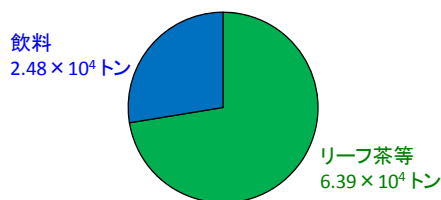


図 3 国内における緑茶茶葉の消費形態（2010 年）

総消費量のうち、28%が飲料原料として使用されたと推測される⁴⁾。

緑茶、紅茶、ウーロン茶とも、ツバキ科ツバキ属のチャ [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]

の新芽を原料に製造される。商業的な茶の生産には、チャの 2 つの変種が主として利用される^{5,6,7,8)}。灌木性で葉の小さな var. *sinensis* は主として緑茶、ウーロン茶に使用され、喬木性で葉の大きな var. *assamica* は主として紅茶の原料として利用される（図 4）^{5,6,7,8)}。

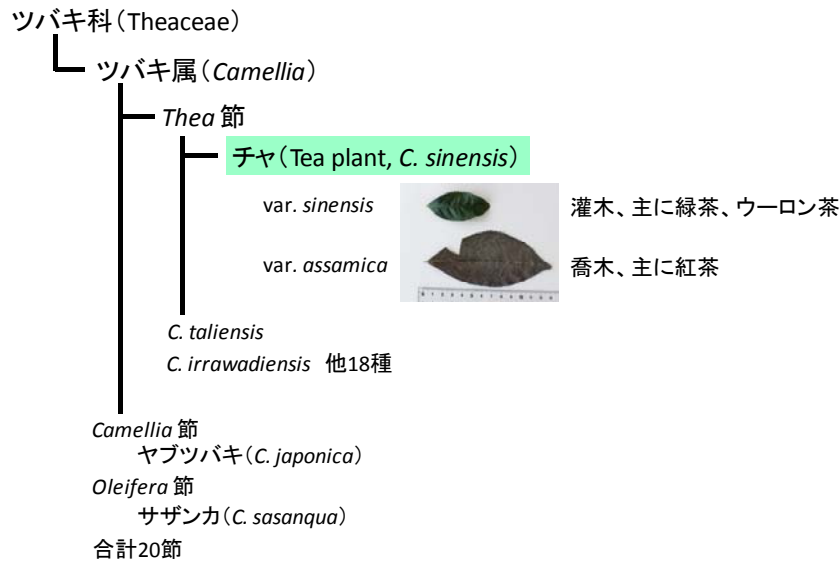


図 4 植物としてのチャ^{5,6,7,8)}

以下本論文では、製茶工程を経た茶葉や茶葉から調製された飲み物を指す場合には「茶」を、作物名や植物の生体には「チャ」を使用する（図 5）。両変種は容易に交配が可能であ

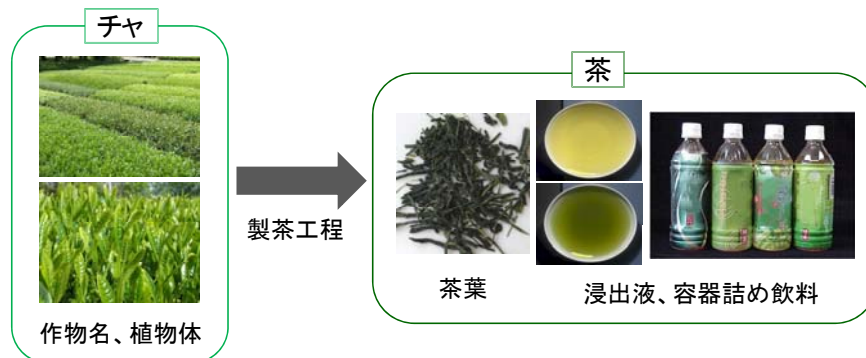


図 5 本論文内の「チャ」と「茶」の用法

作物名および植物体を指す場合は「チャ」を、チャの新芽より製茶工程を経て製造された製品（リーフ、リーフから調製した浸出液）を指す場合は「茶」を使用する。

り、日本においては、熱帯・亜熱帯地方に分布する var. *assamica* を導入し、耐寒性を向上させるため var. *sinensis* との交配を行って国内で栽培可能な紅茶用品種が育成されている⁹⁾。

日本におけるチャ育種の歴史は、生糸と並び茶葉が重要な輸出物資であった明治時代が始まる^{9,10)}。それまでの日本の茶園では、在来チャが栽培されていた。当初は在来チャから優れた個体を選抜して品種としていたが、その後交配による育成が行われるようになった⁹⁾。1953 年にチャについても農林登録制度が発足し、明治期以来育成されていたチャ品種や、これ以降に育成された品種の農林登録が始まった。また農林登録とは別に、種苗法による品種登録制度も整備され、2012 年 4 月現在、117 種のチャ品種が知られている^{11,12)}。しかし、古い品種で現在では栽培されていないものもあり、農林水産省生産局による栽培面積統計でデータが公表されているのは 60 品種である¹³⁾。それによると、国内茶園の品種化率は約 95%であり（残る 5%は在来チャ）、1953 年に農林登録された品種「やぶきた」が単独で国内茶園の 76%を占めている。以下、「ゆたかみどり (5.3%)」、「おくみどり (2.0%)」、「さえみどり (1.9%)」と続くが、第 2 位の「ゆたかみどり」であっても 5.3%に過ぎず、「やぶきた」の寡占状態であると言える¹³⁾。図 6 には 2008 年の統計データより、国内茶園での栽培面積が多い順に 20 品種を示した。チャの経済寿命は 30 年程度とされており、一

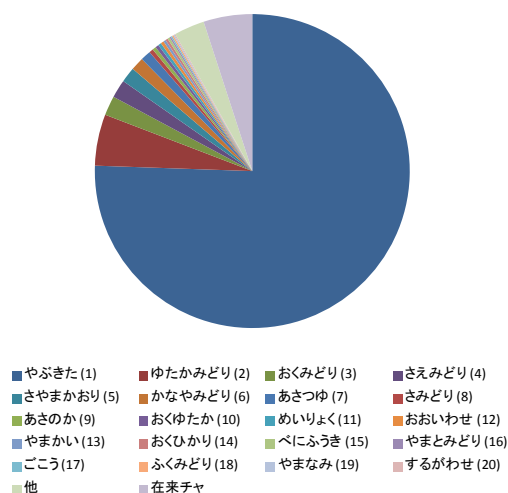


図 6 国内茶園に占める各品種の割合

2008 年の統計データ¹³⁾を基に、栽培面積の上位 20 品種が国内茶園に占める割合を作図した。()内は栽培面積の順位。

度茶園が形成されると定植されたチャは基本的に長い年月栽培、収穫が続けられる。チャは他殖性植物であるため、交配により得られた後代の第 1 代を選抜して品種とし、品種の増殖は挿し木によるクローン増殖によって行う。

チャは工芸作物に分類され、一般の農作物とは異なり圃場で収穫された新芽（生葉ナマハ）が生のまま出荷され、消費されることはない。煎茶を例にとると、生葉は収穫後、ただちに付近の製茶工場に運ばれ、ここで一次産品の荒茶が生産される¹⁴⁾。荒茶は茶市場などを通じて出荷され、各地の茶商などに渡り、ここで最終産物の仕上げ茶となり消費者の手元に届く（図 7）。仕上げの工程では、火入れと呼ばれる加熱を行い、荒茶で 5%程度であった水分含量を 2~3%まで乾燥させると同時に、火香と呼ばれる香気を発揚させる。また、ふるい分けや切断により茶葉の大きさを揃える他、様々な荒茶を用いてのブレンド（合組ゴウグミ）が行われる¹⁵⁾。合組は、一定の品質を持った製品を確保するための技術で、必要に応じて様々な産地、品種の荒茶が使用され、市販されるリーフ茶の大部分では合組が行われている。緑茶飲料の原料についても同様に、一定の品質の飲料となるよう、原料の茶葉は適宜ブレンドが行われる。

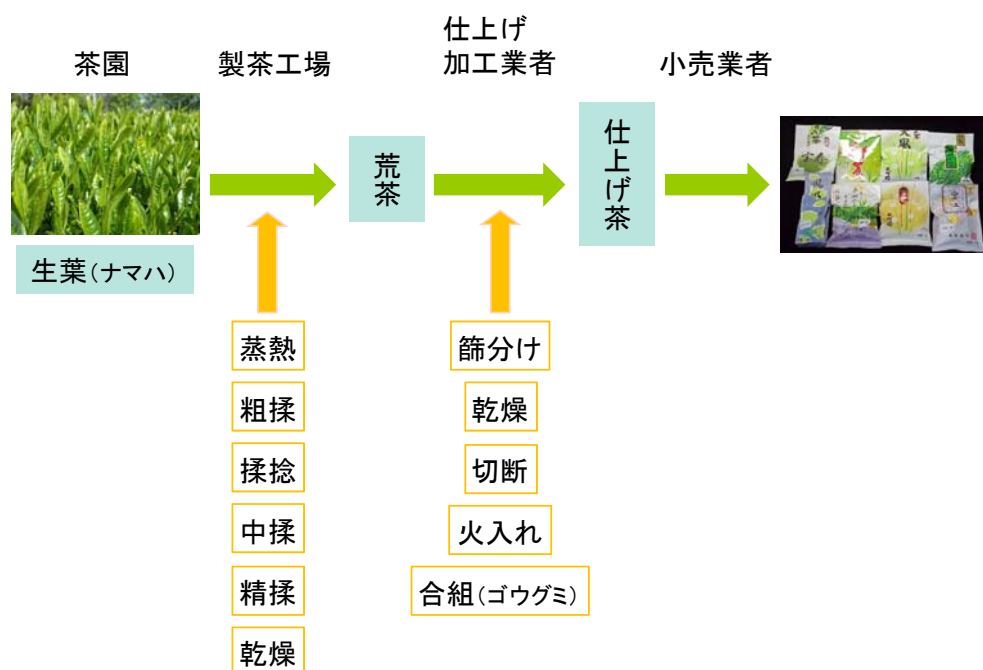


図 7 製茶工程

食品の品質表示に関しては、産地の偽装、品種名の偽装、表示とは異なる生物種の混入といった故意による偽装から、アレルギーとなる生物種の混入といった健康被害の恐れがある事故など、近年多数の報道がなされる通り、社会の意識・関心が高まっている。農産物やそれらを利用した加工食品では、産地や生物種、品種、栽培履歴の偽装表示が問題となることがあり、試料中の安定同位体比^{16,17,18)}や元素組成^{19,20)}、化学成分組成^{18,20)}によるケモメトリクス、DNAやタンパク質分析^{17,21,22)}によるこれらの検証について多数の報告がある。緑茶についても、他の食品同様に検討が行われており、産地については金属元素組成による判別が可能であることが示され²³⁾、有機栽培履歴については、完全な判別は不可能ではあるものの、茶葉中の重窒素の存在比($\delta^{15}\text{N}$ 値)が指標となりうることが示されている²⁴⁾。

本研究においては、品質表示検証技術のうち、品種識別のための基礎的な検討を行った。日本国内での農産物や食品の品質表示等について定めた JAS 法²⁵⁾では、現時点では緑茶の原料品種については表示義務がないものの、様々な理由により、緑茶の原料品種識別技術が必要とされているためである。その理由としては、第一に、茶の含有成分が有する健康機能性についての解明が進むにつれ^{26,27,28)}、緑茶は機能性飲料として消費者からの関心を集めているが、そのような機能性成分の組成には品種による差があることも明らかになってきていること²⁹⁾、また育種分野でも、品質特性に特徴のある品種が育成されてきていることから^{30,31,32)}、機能性、香味といった個性のある緑茶として品種を前面に出した販売を行うケースが増えていることが挙げられる。特定の品種がブランドとして確立された場合には、品種名の偽装表示が起こる可能性が高くなることから、あらかじめ品種識別技術を確立しておく必要がある。原料品種識別技術が必要な理由の第二としては、原産国表示の適正化が挙げられる。JAS 法²⁵⁾では、緑茶の品質表示について、原料として輸入緑茶を使用した場合には原産国を、輸入緑茶をブレンド原料として用いた場合には全原料の原産国を多い順に表示するよう義務付けているが、表示を偽って不当な価格で販売が行われるの

を防止するために、緑茶の原産国を識別可能な技術が必要とされている。また近年、これまで緑茶を飲用する習慣がなかった地域においても、機能性飲料として緑茶が注目され、日本からの輸出も増加傾向にある。実際、2001 年から 2010 年の 10 年間で、日本からの USA やヨーロッパへの緑茶の輸出は 2～3 倍に増加している（図 8）³³⁾。この場合、日本産

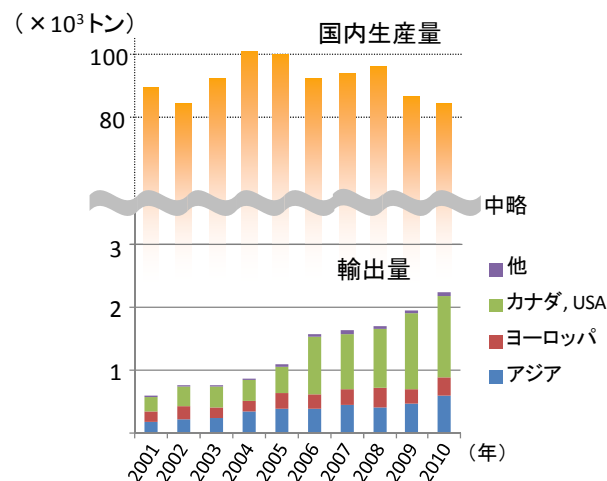


図 8 緑茶（茶葉）の日本国内生産量³⁴⁾と輸出量³³⁾の推移

緑茶のブランド保護のために、日本産緑茶と他国産のものを識別する手段が必要である。金属元素や化学成分組成による原産地判別では、ケニア、インド、スリランカ、中国および日本産茶葉を供試し、アフリカとアジア、アジア内の各産地の判別が可能であったが²³⁾、いずれも 100%がその国の試料の場合であり、各産地の試料をブレンドした場合には判別が不可能となると予測される。輸入緑茶には、日本品種が輸出され、栽培されて製造されるものと、現地の品種が日本緑茶の製法で製造されるものがあるが、現地の品種が原料として用いられた場合には、品種を識別することで原産地も識別が可能であると期待できる。理由の第三としては、知的財産としての品種育成者権の保護の観点によるものである。農作物の品種は、種苗法によりその育成者権が保護されるが、そのような品種の不正な栽培や販売を阻止するために、市販の緑茶で原料品種を識別する必要がある。識別の手段につ

いては、チャでは、一部の機能性成分のように限られた品種のみが含有する成分の有無により判別が可能な場合を除き²⁹⁾、一番茶や二番茶といった萌芽時期や新芽の生育ステージ、栽培管理の違いによる含有成分の変動が激しく^{35,36,37)}、化学成分による品種の同定は不可能である。外観についても、同様に変動が激しい上、茶葉の外観については原料品種ではなく製茶工程の違いによって決定されるものであり、製品になった茶葉の外観から原料品種を同定することは不可能である。従って品種の識別技術は、化学成分や外観によらないものである必要がある。

農林水産物の DNA マーカーは、主として育種分野で利用されてきた^{38,39)}。様々な種類があるが、主要なものについて表 1 に記した。チャについても、収集した遺伝資源や既存

表 1 作物の研究で多用される DNA マーカーとその性質

マーカー	供試DNA量	解析に用いる領域	多型性	分離型	配列情報
RFLP (restriction fragment length polymorphism)	5 ～ 10 µg	1 ～ 10 kb	中	共優性	必要
AFLP (amplified fragment length polymorphism)	50 ng	50 ～ 700 bp	高	優性	不要
RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)	20 ～ 100 ng	300 bp ～ 2 kb	中	優性	不要
CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)	10 ～ 100 ng	200 bp ～ 2 kb	中	共優性	必要
SSR (simple sequence repeat)	1 ～ 20 ng	80 ～ 300 bp	高	共優性	必要
SNP (single nucleotide polymorphism)	10 ～ 100 ng	150 bp 前後	高	共優性	必要

使用実績のあるマーカーを挙げたため、現在では主流ではないものも含まれる。

の品種の遺伝的背景の分析^{40,41)}、害虫に対する抵抗性など、形質に関連する DNA マーカーの発見^{41,42)}、遺伝地図の作成^{41,43,44,45,46)}などの成果が上げられている。近年では、成分含量のように栽培条件等による変化をせず、生物種、品種に固有のものであることから、ゲノム情報を識別する DNA マーカーは品質表示の信頼性確保のための技術として利用されるようになり、遺伝子組換え食品の検出や^{21,22,47)}、農産物を始め魚や肉など水・畜産物やその加工食品の生物種や品種の識別が行われている^{17,21,48,49)}。チャについても、DNA 品種識別技術の開発が行われ、Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)マーカーや、

他種植物の Simple sequence repeat (SSR) マーカーを応用しての日本品種のタイピングの報告があり^{50,51)}製茶された茶葉からの DNA 単離、単離した DNA からの RAPD マーカー解析⁵²⁾や CAPS マーカー⁵³⁾、SSR 他増幅断片長マーカー⁵¹⁾による品種識別が可能であるとされている。しかし、市販緑茶の DNA 品種識別を想定した場合、なお解決すべき課題があり、本研究では、それらについて検討を行った。その課題とは、第一に、国内で緑茶消費量の 28%を占めるボトル詰め飲料からの DNA 単離法が存在せず、分析が不可能であったことである。第二に、ブレンドが行われた試料の原料品種を同定するための手法の検討が行われていなかったことである。第三に、日本産緑茶と外国産緑茶の識別に用いられる両者の差異についての情報が乏しかったことである。そこで本研究では、まず茶試料からの DNA 単離法について検討を行った。試料は、緑茶浸出液、および現行の DNA マーカーを用いてブレンド試料で個別に原料品種を同定するために、リーフ茶の茶葉 1 断片を対象とした (第 1 章)。続いて、ブレンド試料を効率よく分析するための手法として、使用する DNA マーカーの適否について検討し、新規マーカーの開発を行った (第 2 章)。また、輸入緑茶と日本産緑茶を識別するための手法として、日本産チャと中国およびベトナム産チャの葉緑体ゲノムの比較を行った (第 3 章)。

第 1 章 DNA 単離法の検討

食品の DNA 品種識別においては、対象食品から DNA 単離が可能であることが大前提である。農産物およびそれらを原料に製造された食品を対象に、遺伝子組み換え生物 (GMO) の検出や品種識別、生物種の同定を目的として DNA マーカーを用いた分析が行われており^{21,22,47,54)}、その中で加工食品については、オリーブオイル^{55,56,57)}やナタネ油⁵⁸⁾、ワイン⁵⁹⁾、米飯や餅⁶⁰⁾、日本酒⁶¹⁾、麺や菓子など小麦加工食品⁶²⁾、小豆餡^{63,64)}、マロングラッセ⁶⁵⁾などを試料としての原料品種識別が試みられているが、いずれの食品についても、特性を考慮して DNA 単離法には改良が加えられている。茶については、他の農産物とは異なり、圃場で収穫された新鮮葉が生のまま流通、消費されることはない。従って対象となる食品は茶葉（リーフ茶）およびその加工品となる。加工品としては、近年盛んに消費されるようになっているボトル詰め飲料が主たる対象となる。リーフ茶については、既に報告されている共優性の DNA マーカー^{50,51,53)}を用いてブレンドが行われた市販品の原料品種を正確に同定するためには、茶葉を個別にサンプリングし分析する必要がある。現在までに報告されているリーフ茶からの DNA 単離^{50,52,53)}では、複数の茶葉を粉末にして単離操作に用いており、単一の茶葉からの DNA 単離は行われていなかった。また、ボトル詰め緑茶飲料については、DNA 単離の報告はされておらず、単離法を確立する必要があった。

本章では、リーフ茶の茶葉 1 断片からの DNA 単離法の検討（1-1）および、容器入りの緑茶飲料等浸出液からの DNA 単離法の検討（1-2）を行った。

1-1 リーフ茶からの DNA 単離

緑茶について、茶葉から DNA の単離、DNA マーカーによる品種識別が可能であることは既に報告されていたが^{51,53)}、ブレンドが行われた市販のリーフ茶の原料品種を同定するためには、茶葉を個別にサンプリングし分析する必要がある。そこで、茶葉 1 断片からの DNA 単離法について検討することとした。

結果と考察

DNA 単離法としては、植物の DNA 単離に多用され、チャ新鮮葉、リーフ茶からの DNA 単離にも用いられる手法である CTAB 法⁶⁶⁾を使用することとした。茶葉の大きさには様々あるが、いずれにせよリーフ茶の茶葉 1 断片を乳鉢、乳棒を用いて摩砕した場合、茶葉の組織が少なく、乳鉢の表面への付着により、摩砕物の十分な回収が不可能であった。そこで茶葉組織の損失を防ぐため、抽出処理に用いるサンプリングチューブ中で直接茶葉を摩砕することとし、その方法について検討した。

1.5 mL エッペンドルフチューブに茶葉を取り、ペレットホモジナイザー（アズワン）を用いて乾燥した状態のまま摩砕を試みたが、効率的に摩砕することが不可能であった。茶葉は、製造工程の中で数段階の揉捻の操作を受け、葉が堅く丸まって締まった状態で乾燥しており、摩砕が困難である。そこで、摩砕操作に先立って茶葉に水分を含ませ、柔らかくすることとした。1.5 mL エッペンドルフチューブに取った茶葉に、2% CTAB 抽出液 150 μ L を加え、65 °C で 5 min 加熱することで、茶葉が抽出液を吸収し、柔らかくなって摩砕が容易となった。抽出に用いる茶葉は、長さ 0.5 cm 程度から 1.5 cm 程度のものが扱い易く、抽出液に全体が浸かるよう、長い茶葉はチューブに取る際にあらかじめ折った。また必要以上に長い茶葉の場合は、約 1.5 cm 分を折り取って使用した。茶葉に含まれる薄い色をした茎は、摩砕が困難であるため避けた。抽出に用いた茶葉 1 断片の平均的な重さは、5.29 mg (n=14) であった。

茶葉 1 断片、および乳鉢、乳棒で摩砕した茶葉約 20 mg から単離した DNA の、吸光度より算出された収量および純度を表 2 に示した。

続いて、単離した DNA のアガロースゲル電気泳動および PCR によるフラグメントの増幅を行った結果を図 9 (A) に示した。「やぶきた」、「おくみどり」、「めいりよく」、「おくゆたか」、「さえみどり」の 5 品種から製茶した茶葉 1 断片から単離した DNA を泳動すると、対照とした新鮮葉由来の DNA に比べ低分子量側にシグナルが見られ、断片化していた。これ

表 2 リーフ茶から単離された DNA の収量と純度

	茶葉 (mg)	濃度 (ng/ μ L)	DNA 収量 (μ g/茶葉 1 mg)	A260/A280	A260/A230
茶葉 1 断片	5.29	154	5.6	1.85	1.82
茶葉粉末	25.8	268	2.7	1.91	1.73

いずれも n=14

らの DNA を鋳型に用いて 1365 bp のフラグメントの増幅を行った結果を図 9 (B)に示した。いずれの品種についても、対照とした新鮮葉由来 DNA 同様にフラグメントの増幅が見られた。

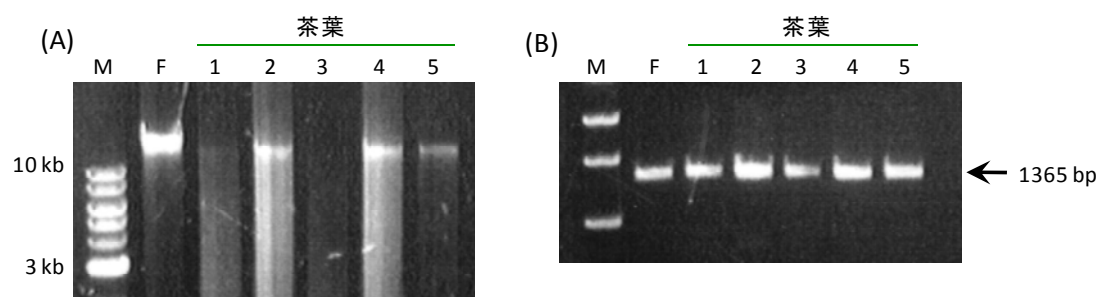


図 9 リーフ茶より単離した DNA とそれらを用いたフラグメント増幅

(A) 単離した DNA の 1%アガロースゲル電気泳動

M : 1 kb DNA Ladder (NEB)、F : positive control (「さえみどり」新鮮葉)、
1 : 「やぶきた」、2 : 「おくみどり」、3 : 「めいりよく」、
4 : 「おくゆたか」、5 : 「さえみどり」

(B) 単離した DNA からの 1365 bp の CAPS フラグメントの増幅

M : 1 kb DNA Ladder (NEB)、F : positive control (「さえみどり」新鮮葉)、
1 : 「やぶきた」、2 : 「おくみどり」、3 : 「めいりよく」、
4 : 「おくゆたか」、5 : 「さえみどり」

Ujihara et al. *Food Sci. Technol. Res.* **11**: 43-45 (2005)より許可を受けて転載。©2005 公益社団法人日本食品科学工学会

煎茶以外に、原葉の栽培法が異なる緑茶である玉露、てん茶、および抹茶について、DNA 単離およびフラグメント増幅を行った。玉露、てん茶は、生育中の新芽に菰・藁や化学繊維で覆いをし、20～30 日間ほど遮光処理（段階を追って、最終的に 98%以上）して栽培した原葉を、玉露では煎茶と同様に製茶した緑茶で、鮮やかな緑色の外観と強いうま味を有

する³⁾。てん茶は、玉露と同様に栽培した原葉をてん茶炉で製造した緑茶で、生葉は蒸された後は煎茶と異なり揉む操作を加えることなく乾燥されるため、完成したてん茶は新鮮葉の形態を残した外観をしている³⁾。てん茶から茎や葉脈を除去し、石臼で粉末化したものが抹茶である。各茶種とも煎茶同様に DNA 単離およびフラグメント増幅が可能であった (図 10)。ただし、玉露、てん茶については茶葉 1 断片のサンプリング、個別分析が可能であるが、抹茶は既に粉末化されているため、複数の原料品種からなる試料の場合は個別の品種の同定が不可能であり、原料品種が単一もしくは明記されている場合の真贋判定といった形での分析に限定される。

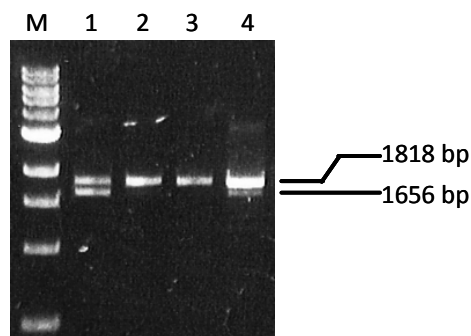


図 10 各種緑茶より単離した DNA からの CAPS フラグメント増幅

M : 1 kb DNA Ladder (NEB)、1 : 煎茶、2 : 玉露、3 : てん茶、
4 : 抹茶
増幅断片長多型 (ALP) により、2 本のバンドを生じる試料がある。

また、緑茶以外の茶種として、野菜茶業研究所金谷拠点で製造された紅茶およびウーロン茶それぞれ数点ずつを用いて DNA 単離、フラグメント増幅を試みたが、DNA は単離されるものの、フラグメント増幅については両茶種とも成功するサンプルとしないサンプルがあった (データ省略)。

ブレンド試料の原料品種分析に関して、「やぶきた」と「めいりよく」の 2 品種を原料に用いた市販リーフ茶を入手し、ブレンド割合の推定を試みた。茶試料より、24 片の茶葉断片をサンプリングし、個別に DNA を単離し、両品種の示すパターンが異なるマーカー

表 3 市販リーフ茶茶葉の個別分析による原料品種とブレンド割合の確認

品種	茶葉数	比率 (%)
やぶきた	17	71
めいりよく	7	29

DFRintron4+5/*Hpa* II により両品種を識別した。表 3 に示すように、24 断片中「やぶきた」

が 17 片、「めいりよく」が 7 片で、この試料では「やぶきた」と「めいりよく」がおおよそ 7 : 3 の割合でブレンドされていると推定できた。このことから、茶葉 1 断片を個別に分析することにより、ブレンドが行われたリーフ茶についても原料品種の同定、および複数の茶葉をサンプリングすることで原料品種のブレンド割合が推定可能であることを実証できた。

1-2 浸出液（緑茶飲料）からの DNA 単離

市販の容器入り緑茶飲料には、缶に入ったもの、PET ボトルに入ったものなど、いくつかの形態があるが、一般的に図 11 に示すような工程で製造される⁶⁷⁾。消費者が急須などの

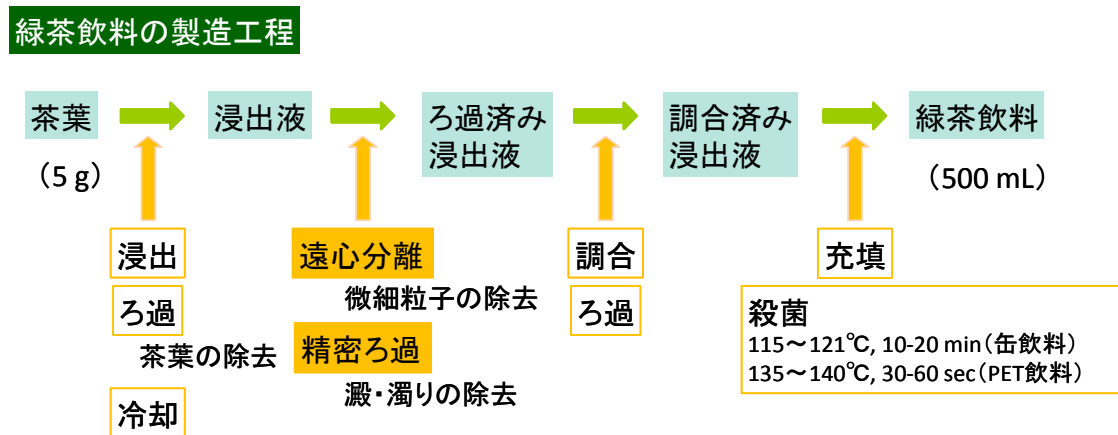


図 11 ボトル詰め緑茶飲料の製造工程
澱や濁りを除去するために、遠心分離や精密ろ過が行われる⁶⁷⁾。

茶器を用いて自ら調製する浸出液と比べ、市販の緑茶飲料では、茶葉に対する湯の量が多く、浸出液が薄くなっている。急須を用いる場合、「茶の淹れ方研究会」による煎茶の淹れ方の検討では、10 g の煎茶（並）の茶葉を 430 mL の湯で浸出した場合に官能評価の点数が最も高く、美味しい淹れ方として提唱されている⁶⁸⁾。これを基に算出すると、500 mL の湯を使用する場合には茶葉は 12 g を使用することになる。一方、緑茶飲料では、各メーカーとも茶葉／湯量の比等詳細な製造法について公開していないが、500 mL の浸出液に使用される茶葉は 5 g 程度であると推計されている⁴⁾。缶飲料についても、30~45 g／3 L 程度の茶葉／湯量比であると推測されている⁶⁹⁾。また、緑茶飲料では、遠心分離や精密ろ過により、澱や濁りの構成成分であるタンパク質、多糖類⁷⁰⁾といった高分子化合物が除去され、発生が抑制される。これは、特に容器が透明な PET ボトル詰め飲料で、澱や濁りがカ

びや異物と誤認され、メーカーにクレームが寄せられる原因となるためである。緑茶浸出液からの DNA 単離の報告はなく、単離法を検討する必要があった。

結果と考察

まず、浸出液を直接 PCR の反応液に添加した場合、また浸出液をイソプロピルアルコール沈殿処理して得た沈殿を溶解して PCR の反応液に添加した場合、また浸出液を同量の CTAB 抽出液に添加し、茶葉からの DNA 単離と同様の処理を行い得られた沈殿を溶解して PCR の反応液に添加した場合には、フラグメントの増幅は見られなかった。ポリフェノールは PCR を阻害することが知られているが^{71,72,73,74}、緑茶浸出液にはポリフェノールの一種であるカテキン類が多量に含まれる。このカテキン類を除去するため浸出液を同量の酢酸エチルで 3 回抽出し、水層を回収してイソプロピルアルコール沈殿を行い、CTAB 抽出により得られた沈殿を溶解して PCR の鋳型としたが、増幅は見られなかった。

最終的に、浸出液を凍結乾燥にて濃縮後、イソプロピルアルコール沈殿処理し、得られた沈殿を溶解して同量の CTAB 抽出液を加え、茶葉からの DNA 単離と同様の処理を行い、得られた沈殿を溶解して市販の DNA 抽出キットによる精製を行うこととした。DNA 単離法の検討には、緑茶飲料のモデルとして、野菜茶業研究所金谷拠点で製造された単一品種のリーフ緑茶より調製した浸出液を用いた。飲料の製法として、濃い濃度で調製した浸出液を 5 倍程度に希釈して容器詰めする場合と、最初から飲用濃度で調製して容器詰めする場合がある。モデル浸出液についても、同様に希釈を行った場合と行わない場合の浸出液を調製して実験に用いた。浸出液の清澄化のモデルとして、混合セルロースエステルフィルター（孔径 0.2 μm 、東洋濾紙）によるろ過を行った。野菜茶業研究所金谷拠点において製造された 6 品種（やぶきた、おくひかり、おくみどり、めいりよく、さえみどり、さやまかおり）のリーフ茶 5.00 g より調製した 500 mL の浸出液を試料とした場合の DNA 収量および純度を表 4 に示した。表中の「浸出時の湯量」は、前述の飲料の製法の違いに

表 4 モデル浸出液から単離した DNA の収量と純度

品種	浸出時の湯量 (mL)	DNA 濃度 (ng/ μ L)	DNA 収量 (μ g)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
やぶきた	100	84.9	6.37	1.91	1.14
	500	115	8.62	1.89	1.16
おくひかり	100	326	24.5	1.83	1.77
	500	182	13.6	1.86	1.40
おくみどり	100	164	12.3	1.88	1.43
	500	308	23.1	1.88	1.73
めいりよく	100	771	57.8	1.83	2.29
	500	537	40.3	1.86	1.99
さえみどり	100	207	15.5	1.89	1.42
	500	440	33.0	1.82	2.04
さやまかおり	100	224	16.8	1.77	1.94
	500	164	12.3	1.76	1.63

Ujihara *et al.* *Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。

©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

に基づき、希釈を行う場合（100 mL）と行わない場合（500 mL）を模している。100 mL の熱湯で調製された浸出液は、希釈して液量 500 mL としてから DNA 単離に用いた。単離操作開始時に 500 mL であった浸出液は、最終的に約 75 μ L に濃縮された。モデル浸出液からの DNA の収量は、6.37 μ g～57.8 μ g と試料により異なったが、茶葉／湯量の比の違いによる差異は見られなかった。リーフ茶より DNA を直接単離した場合と比較し、モデル浸出液では回収された DNA 量は少なかった。リーフ茶 1 断片（平均的な重さは 5.29 mg、n=14）を試料とした場合の収量より推計すると、リーフ茶 5.00 g を直接抽出した場合の DNA 収量の平均値は 13.3 mg であるが⁷⁵⁾、リーフ茶 5.00 g を用いて調製した浸出液からの DNA 収量の平均値は 22.0 μ g（n=12）であった。浸出液より単離された DNA の純度について、A₂₆₀/A₂₈₀、A₂₆₀/A₂₃₀ 比の平均値はそれぞれ 1.85、1.66 であった。

続いて、この単離法を用いて市販の PET ボトル入り緑茶飲料からの DNA 単離を試みた。10 メーカーの 16 銘柄の PET ボトル入り緑茶飲料 34 本を供試した結果を表 5 に示した。DNA の収量は 0.750～234 μ g と試料により異なり、同一の銘柄内でもばらつきがあった。A₂₆₀/A₂₈₀、A₂₆₀/A₂₃₀ 比の平均値はそれぞれ 1.65、1.13 であった。

表 5 PET 緑茶飲料から単離した DNA の収量と純度

メーカー	銘柄 (供試数)	最高／最低 濃度 (ng/μL)	平均濃度 ^a (ng/μL)	DNA 収量 ^a (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ^a	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ ^a
A	a (8)	2860/65.1	1350	101	1.74	1.81
	b (1)	—	10.0	0.750	1.49	0.72
	c (1)	—	572	42.9	1.66	1.30
	d (1)	—	69.8	5.23	1.59	0.55
B	a (5)	544.6/27.3	239	17.9	1.72	1.17
	b (2)	2045/1499	1772	133	1.79	1.95
C	(3)	1082/732.4	894	67.0	1.76	1.60
D	a (2)	535.5/507.4	521	39.1	1.78	1.77
	b (1)	—	3120	234	1.80	2.23
E	(3)	362.5/76.3	219	16.4	1.73	1.11
F	(2)	65.1/59.0	62.1	4.66	1.69	0.83
G	(1)	—	61.5	4.61	1.49	0.72
H	(1)	—	30.8	2.31	1.37	0.39
I	(1)	—	46.6	3.50	1.38	0.49
J	(1)	—	35.6	2.67	1.62	0.46
K	さえみどり (1)	—	126	9.44	1.71	0.90

^a 試料が複数の場合には平均値Ujihara *et al. Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。

©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

単離した DNA から各 200 ng 相当をアガロースゲル電気泳動にかけた結果を図 12 に示した。対照とした新鮮葉、リーフ茶由来の DNA に比べ、モデル浸出液、市販の緑茶飲料とも、単離された DNA の分子量は小さかった。特に市販の緑茶飲料では、モデル浸出液と比較しても DNA が低分子化していた。吸光度より算出した DNA 濃度に基づき、各レーンには同量の DNA を用いたが、実際のスポットの蛍光強度はばらついた。これは、表 4、5 の A₂₆₀/A₂₈₀ 比および A₂₆₀/A₂₃₀ 比が比較的低いことが示唆するように、夾雑物が DNA 溶液に残存するためであると考えられる。また、モデル浸出液に比べ市販緑茶飲料で単離された DNA の分子量が小さかった理由については、緑茶飲料製造の過程で行われる精密ろ過や遠心分離によって、比較的分子量の大きな DNA が除去されたこと、あるいは市販緑茶飲料の平均的な pH は 6.1 (n=11) と、通常 DNA の溶解に用いる TE バッファの pH (8.0) より低く、弱い酸性であることから、保存中に分解が起こったことなどが考えられるが、詳

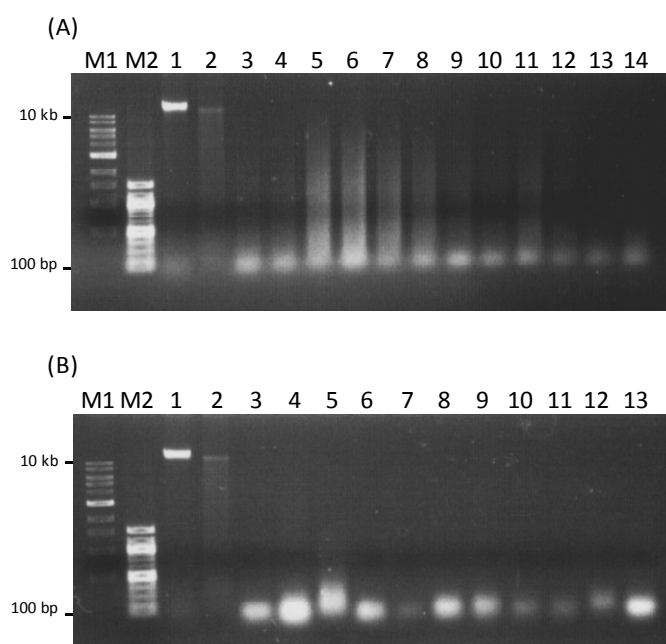


図 12 緑茶浸出液より単離した DNA の 0.8%アガロースゲル電気泳動

いずれも約 200 ng を泳動に用いた。

(A) モデル浸出液より単離した DNA

M1 : 1 kb DNA Ladder (NEB)、M2 : 100 bp DNA Ladder (NEB)、
 1 : positive control (「やぶきた」新鮮葉)、2 : 「やぶきた」リーフ茶、
 3 : 「やぶきた」湯量 100 mL、4 : 「やぶきた」湯量 500 mL、5 : 「おくひ
 かり」湯量 100 mL、6 : 「おくひかり」湯量 500 mL、7 : 「おくみどり」
 湯量 100 mL、8 : 「おくみどり」湯量 500 mL、9 : 「めいりよく」湯量 100
 mL、10 : 「めいりよく」湯量 500 mL、11 : 「さえみどり」湯量 100 mL、
 12 : 「さえみどり」湯量 500 mL、13 : 「さやまかおり」湯量 100 mL、14 :
 「さやまかおり」湯量 500 mL、

(B) 市販 PET 緑茶飲料より単離した DNA

M1 : 1 kb DNA Ladder (NEB)、M2 : 100 bp DNA Ladder (NEB)、
 1 : positive control (「やぶきた」新鮮葉)、2 : 「やぶきた」リーフ茶、
 3 : A-a、4 : B-a、5 : C、6 : D-a、7 : E、8 : F、9 : G、10 : H、11 : I、
 12 : J、13 : K (さえみどり)

Ujihara *et al. Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。

©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

細は明らかではない。

緑茶浸出液から単離した DNA について、DNA マーカーによる品種識別が可能であるか
 確認するため、市販緑茶飲料由来の DNA について、PCR によるフラグメント増幅を行っ
 た。既存の CAPS フラグメントは、長さが約 200 ～1500 bp であり、アガロース電気泳動

によって増幅確認を行う。浸出液由来 DNA では、CAPS フラグメントの増幅は見られなかった。そこで、より短いフラグメントを対象とすることとし、また検出感度とフラグメントサイズの分析精度を上げるため、蛍光標識プライマーを用い、電気泳動には DNA シーケンサーを用いることとした。フラグメントサイズとして約 160 bp と約 105 bp の 2 種類を選択し、まずは約 160 bp フラグメントの増幅確認を行い、増幅の見られなかった試料については約 105 bp フラグメントの増幅確認を行った。増幅の成否を表 6 に示した。供試した

表 6 PET 緑茶飲料から単離した DNA での SSR フラグメント増幅

メーカー	銘柄 (供試数)	TMSLA13-L 約 160 bp	TMSLA10-L 約 105 bp	増幅失敗
A	a (8)	4	2	2
	b (1)	1	— ^a	—
	c (1)	1	—	—
	d (1)	1	—	—
B	a (5)	4	1	—
	b (2)	2	—	—
C	(3)	2	1	—
D	a (2)	2	—	—
	b (1)	1	—	—
E	(3)	3	—	—
F	(2)	2	—	—
G	(1)	1	—	—
H	(1)	—	1	—
I	(1)	—	1	—
J	(1)	1	—	—
K	さえみどり(1)	1	—	—

^a 160 bp のフラグメントが増幅した試料では 105 bp の増幅は行わなかった。

Ujihara *et al. Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。
©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

34 試料のうち 26 試料では、160 bp のフラグメントの増幅が確認できた。160 bp フラグメントが増幅しなかった 8 試料のうち、6 試料は 105 bp フラグメントが増幅できた。2 試料については、105 bp フラグメントの増幅も確認できなかった。この 2 試料について、片方は濃度約 65 ng/μL、A₂₆₀/A₂₈₀ 比 1.52、A₂₆₀/A₂₃₀ 比 0.641 と比較的 DNA 濃度および純度が

低かったが、片方は濃度約 783 ng/μL と比較的収量が多く、 A_{260}/A_{280} 比 1.77、 A_{260}/A_{230} 比 1.84 と、市販緑茶飲料での平均値 (A_{260}/A_{280} 比 1.65、 A_{260}/A_{230} 比 1.13) よりも高かった。

PCR での増幅に失敗する場合、鋳型とした DNA 溶液に不純物が混入し、反応を阻害していることがあり、DNA 溶液を希釈して鋳型に用いることで阻害物質の影響を免れることがあると経験的に知られている。そのため、本実験においても、増幅の見られなかった試料について、DNA 溶液を希釈して再増幅を試みた。濃度約 65 ng/μL の試料は 10 倍に希釈して濃度約 6 ng/μL とし、濃度約 783 ng/μL の試料は 80 倍に希釈して濃度約 10 ng/μL とし、それぞれ 1 μL を PCR 反応液に添加したが、フラグメントの増幅は見られなかった。これらの試料について、葉緑体ゲノム上の SSR フラグメント増幅のために設計されたプライマー対を用いて増幅を試みたところ、増幅産物が得られた。このことから、各試料には DNA は含まれるが、低分子量の断片が多く、PCR の鋳型となり得る分子量の断片は十分に存在しないものと考えられた。一般に、葉緑体 DNA は核 DNA に比べ細胞当たりのコピー数が多いことから、核 DNA と同様に分解を受けても PCR の鋳型となり得る分子量の断片が残存する量が多かったことが、核ゲノムフラグメントの増幅が見られず葉緑体ゲノムフラグメントでは増幅が見られた理由であると考えられる。

以上より、PET ボトル詰め飲料等緑茶浸出液を試料として品種識別を行うために、緑茶浸出液からの DNA 単離法の確立を試み、浸出液を濃縮後に単離・精製を行うことにより、DNA の単離を可能とした。単離された DNA からは 200 bp 未満の短いフラグメントの増幅が可能であった。

実験方法

1-1 リーフ茶からの DNA 単離

実験材料

供試した茶は、野菜茶業研究所金谷拠点において栽培、製造されたもの、および小売店にて購入した市販品である。

DNA 単離

リーフ茶からの DNA 単離には、改変を加えた CTAB 法⁶⁶⁾を用いた。リーフ茶の茶葉 1 断片を 1.5 mL エッペンドルフチューブに取り、2×CTAB 抽出液 650 μ L を加えて 65°C で 5～10 分間加熱し、抽出液を吸収した茶葉をマイクロチューブ用ホモジナイザーで摩砕し 10 mg/mL RNaseA 2 μ L を加えた。以後の操作は既報⁶⁶⁾に従った。摩砕物を 1 時間インキュベートし、途中で数回懸濁を行った。インキュベート終了後、摩砕物に CIA（クロロホルム：イソアミルアルコール 24:1、v/v）650 μ L を加えて混和後 16,000 g で 1 分間、室温で遠心分離をし、水層を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに取って再度 CIA 抽出を繰り返した。水層を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに取り、イソプロピルアルコール 600 μ L を加えて混和し、16,000 g で 1 分間、室温で遠心分離した沈殿を 250 μ L の 70% エタノールで洗浄後同様に遠心分離し、上清を除いて数分間風乾した後、沈殿を 200 μ L の TE バッファーに溶解し DNA 溶液とした。

CAPS マーカーによるタイピング

使用した CAPS マーカーは、Kaundun and Matsumoto（2003）により開発されたものを用いた⁵⁰⁾。

PCR 反応には *ExTaq* DNA polymerase（タカラバイオ）を用い、反応液は、50～200 ng の DNA、各プライマーを 0.25 μ M、dNTP 200 μ M、MgCl₂ 2 mM、酵素に添付の反応バッファー、0.025 U の *ExTaq* DNA polymerase を含み、滅菌水を用いて 25 μ L に定容した。

PCR 反応は、94°C で 5 分間インキュベートの後、94°C を 30 秒、60°C を 1 分、72°C を 90 秒のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C で 10 分間インキュベートした。

通常、PCR 反応液 2 μ L を制限酵素処理に用いた。各制限酵素の取扱説明に従い、反応至適温度で 2 時間インキュベートした。

反応後、断片パターンの検出にはアガロースゲル電気泳動を用いた。ゲル濃度は 2% とした他は、単離 DNA の電気泳動と同様の操作をした。

1-2 浸出液（緑茶飲料）からの DNA 単離

実験材料

茶葉は、野菜茶業研究所金谷拠点で製造した。

市販 PET 緑茶飲料は、小売店で購入した。

モデル浸出液の調製

野菜茶業研究所金谷拠点で製造された 6 品種（やぶきた、めいりよく、おくひかり、おくみどり、さえみどり、さやまかおり）の緑茶茶葉を以下の 2 条件で浸出した。

<条件 1>茶葉 5.00 g を、あらかじめ湯浴を用いて 60°C に温めた純水 100 mL に加え、マグネティックスターラーにより攪拌しながら湯浴中で 4 分間浸出した。液面に浮いた茶葉はガラス棒を用いて液中に沈めた。茶こしを用いて茶葉を除去しながら、浸出液を別のガラスビーカーに移し、氷浴中で 20°C 程度に冷却した。冷却した浸出液を東洋濾紙製 Advantec No. 2 ろ紙でろ過し、純水で液量を 500 mL に調整した。

<条件 2>茶葉 5.00 g を、あらかじめ湯浴を用いて 60°C に温めた純水 500 mL に加え、マグネティックスターラーにより攪拌しながら湯浴中で 4 分間浸出した。以降ろ紙によるろ過までの操作は条件 1 と同様であるが、液量の調整は行わなかった。

<条件 1>、<条件 2>とも、得られた浸出液にアスコルビン酸ナトリウム 0.10 g を添加した後、清澄化のためにセルロースアセテートメンブレン（孔径 0.2 μ m、直径 47 mm、東

洋濾紙) でろ過してモデル浸出液とした。

緑茶浸出液からの DNA 単離

モデル浸出液もしくは市販緑茶飲料 500 mL を 2L 容のガラス製ナス型フラスコに入れ、液体窒素を用いて凍結させた後凍結乾燥機 (東京理科器械 FDU-2100 型) を用いて乾燥させた。乾燥物に 40 mL の純水を加え、半量 (20 mL) ずつ 2 本の 50 mL ファルコンチューブに移した。各遠沈管に、3 M 酢酸ナトリウム水溶液 2 mL とイソプロピルアルコール 20 mL を加え、混和した後、各遠沈管の混和物を半量 (21 mL) ずつポリプロピレン製 50 mL 容遠沈管に移し (合計 4 本)、18,800 g、15°C で 15 分間遠心分離した (日立製作所 Himac CR21 型)。上清を捨て、沈殿を 4 mL の 70%エタノールで洗浄し、18,800 g、15°C で 5 分間遠心分離した。上清を除いて沈殿を空气中で数分間乾燥させ、4 本の遠沈管の沈殿を合わせて 1 mL の TE バッファーに溶解した。

1 mL の溶液を半量 (500 μ L) ずつ 2 本の 1.5 mL エッペンドルフチューブに分け、等量の 2 \times CTAB 抽出液および RNaseA 溶液 (10 mg/mL) 2 μ L を加えた。以降の CTAB 法による DNA 単離は、リーフ茶からの DNA 単離法と同様に行った。沈殿物は 100 μ L の TE バッファーに溶解した。

100 μ L の DNA 溶液を精製するために、QIAGEN 社製 QIAEX II Gel Extraction Kit を用いた。QX1 バッファー 300 μ L および QIA EXII 40 μ L を DNA 溶液に加え、マニュアルに従って精製を行った。最終的に、75 μ L の DNA 溶液が得られた。

DNA 濃度測定

得られた DNA 溶液の濃度は、分光光度計 (GE Healthcare 社製 Nano Vue) により 260 nm での吸光度を測定することで算出した。純度の推定のために、280 nm および 230 nm での吸光度も測定し、260 nm における吸光度との比を算出した。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルの作成には、日本ジーン社製 Agarose S を用いた。ゲル濃度は 0.8%(w/v)

とし、ゲル作成および電気泳動には TAE バッファーを用いた。各試料とも、約 200 ng の DNA を泳動に用いた。泳動にはアドバンス社製 Mupid-2plus を用い、バンドの検出のためにエチジウムブロミドをゲルおよび泳動バッファーに添加した。

CAPS マーカの増幅と増幅確認

単離した DNA を用いた CAPS マーカの増幅確認は、第 1 章 1-1 節と同様に行った。

SSR マーカの増幅と増幅確認

チャ核ゲノム上の SSR 増幅用に設計された 2 対のプライマー TMSLA13 (増幅産物は約 160 bp) および TMSLA10 (増幅産物は約 105 bp)、およびチャ葉緑体ゲノムより設計した 123 bp の増幅産物が得られるプライマー対を用いた。各マーカの詳細は第 2 章 2-1 節に記載した。葉緑体 SSR 増幅用プライマーの配列は以下の通り。

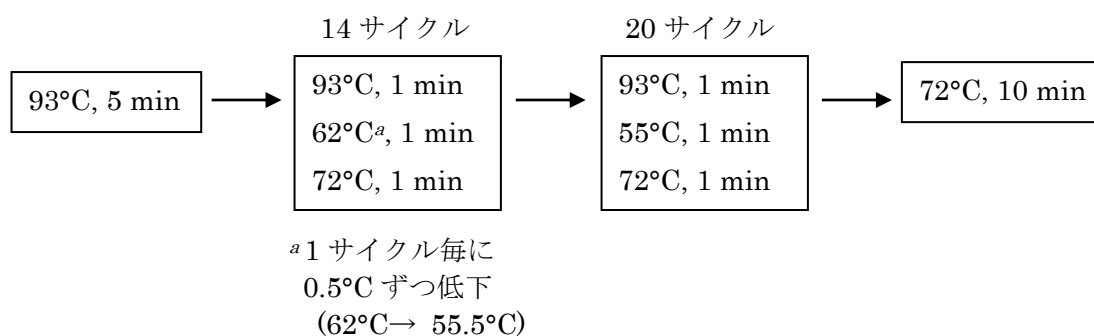
Forward : 5'-HEX-TTAGACGAGATTTTACGAACAAAAA-3'

Reverse : 5'-CCGAATAAACATATAAATCGAATCAC-3'

PCR には KOD DNA polymerase (東洋紡) を用いた。PCR 反応液の組成は、100~300 ng の浸出液由来 DNA、プライマー各 0.20 μ M、dNTP mix 0.16 mM、MgCl₂ 1.0 mM、酵素に添付の反応バッファー、KOD DNA polymerase 0.025 U を含み、滅菌水で容量を 15 μ L とした。KOD の代わりに *ExTaq* DNA polymerase (タカラバイオ) を用いる場合の反応液は、100~300 ng の浸出液由来 DNA、プライマー各 0.25 μ M、dNTP mix 0.20 mM、MgCl₂ 2.0 mM、酵素に添付の反応バッファー、*ExTaq* DNA polymerase 0.025 U を含み、滅菌水で容量を 15 μ L とした。

PCR の反応条件は、田中ら(2004)に従った⁷⁶⁾。概要を図示した。

<SSR フラグメント増幅用 PCR プログラム ⁷⁶⁾>



PCR 反応液 1 μL を、12.375 μL の脱イオン化ホルムアミド（ナカライテスク） および 0.125 μL の GeneScan 500 もしくは 350 ROX size standard（アプライドバイオシステムズ）と混和し、95°C で 2 分間加熱し氷浴により急冷した後、DNA シーケンサー（アプライドバイオシステムズ ABI 310 Genetic analyzer）により電気泳動を行った。泳動後のデータ処理には付属のソフトウェア（GeneScan）を用いた。必要に応じて PCR 反応液は滅菌水で希釈の上 1 μL を電気泳動に用いた。

第 2 章 核ゲノムを用いた品種識別

2-1 Simple sequence repeat (SSR) マーカーを用いた品種識別

SSR は、short tandem repeat、マイクロサテライトとも呼ばれ、1~6 bp 程度の短い塩基配列のモチーフが 10~60 回程度繰り返された構造をしている⁷⁷⁾。最も多く見いだされるのは、2 塩基をモチーフとする dinucleotide repeat である。SSR は、ゲノム上に 10^{4-5} /haploid 程度の頻度で散在するとされ、リピート数に変異が生じやすく、多型性に富む⁷⁷⁾。この多型性の高さから、農学の分野でも多用されている^{77,78,79,80)}。チャを含むツバキ (*Camellia*) 属では、種間の植物同士での遺伝的関係の解析⁸¹⁾チャおよびツバキの系統分析^{82,83)}、ヤブツバキ (*Camellia japonica* L.) 核ゲノム上の SSR およびタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) 葉緑体ゲノム上の SSR をチャに応用し、品種識別を試みた例がある⁸⁴⁾。また遺伝マップ作成への応用例がある⁴⁶⁾。

本章では、新たにチャゲノムより単離された SSR について、主要な国産品種の識別およびリーフ茶、緑茶飲料の原料品種識別への利用が可能であるか検討した。

結果と考察

2-1a 主要な国産品種の識別

国内の栽培面積の約 91%を占める主要品種 16 種¹³⁾のチャ新鮮葉より単離した DNA を試料とし、チャゲノム上の 6 個の SSR 遺伝子座を対象に設計したプライマー対を用いて、各品種のタイピングを行った。プライマー対を表 7 に示した。

表 7 本研究に用いたチャ由来の SSR マーカー

フラグメント	locus	プライマー名	primer sequence (5' - 3') ^a
TMSLA10	TMSLA10	LA10-Fw	gtttcttTCATCATAGACCAATTAATCAACAAAGCA
		LA10-Rv	HEX-TTTGCCACAAGTGAAAGGGTTTT
TMSLA13	TMSLA13	LA13-Fw	gtttcttGCGATTTCTAGCTCTCAACACTGTTC
		LA13-Rv	HEX-TGATTTCCAGTTCTAGATCGCGAT
TMSLA17	TMSLA17	LA17-Fw	HEX-AACCACACCTGACACCAAGACTTCT
		LA17-Rv	gtttcttTGCCAGAGACTGGTGAGGTGTT
TMSLA37	TMSLA37	LA37-Fw	HEX-GGAGCCTTAAATTTTTGGTTTAAAGAGTG
		LA37-Rv	gtttcttTAGAAAAAATTATCAAAGCTCAAATCTTGC
TMSLA55	TMSLA55	LA55-Fw	HEX-CCCGAACTGAAATTACTATTATACCCCT
		LA55-Rv	gtttcttCCCTACAATGAGTCAACAAATCCCTA
SSR-1	MSCjaF25	SSR1-Fw	HEX-TTAAGCAAAGAAGTCGCG
		SSR1-Rv-2	GACCTACGTTAGATTTTAGATAGC

^a gtttctt : 増幅産物の二次構造を阻害するための pigtail 配列

Ujihara *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20 (2009)より許可を受けて転載。

©2009 公益社団法人日本農芸化学会

SSR マーカーでは、各 allele はモチーフの繰り返し数が異なり、PCR による増幅では、各 allele は鎖長の異なる増幅フラグメントを与え、各品種は保有する allele の違いに基づくピークパターンを示す。ピークパターンを表すのには、そのマーカーで検出された全ピークを羅列する。キャピラリーシーケンサーを用いた電気泳動では、増幅フラグメントのピークの鎖長は、共に泳動するサイズマーカーのピークとの比較によりソフトウェアが算出するため、整数とはならない。また、同じ品種を分析した場合でも、シーケンサーの機種等により算出されるフラグメントサイズは変動するため、品種識別において、算出されたフラグメントサイズをそのまま比較することは適当ではない。独立行政法人 種苗管理センターによる「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」では、この問題を解消するために、基準品種を設定し、他の品種のフラグメントサイズについては基準品種のものからの距離で表すことを推奨している⁸⁵⁾。本研究においても、この表現形式を採用

することとし、基準品種は現在国内で最も多く栽培されている「やぶきた」を用いることとした。ヘテロ接合のため複数のピークが見られる場合は、鎖長の短いピークを基準とした。「やぶきた」でピークが得られない場合は、栽培面積第2位の「ゆたかみどり」のピークを基準とした。基準となるピークの鎖長を A とし、他のピークは $A \pm N$ (N は整数) の形で鎖長を表した (図 13)。ピークパターンの「 $A+N_1/A+N_2$ 」は、そのマーカーでフラグ

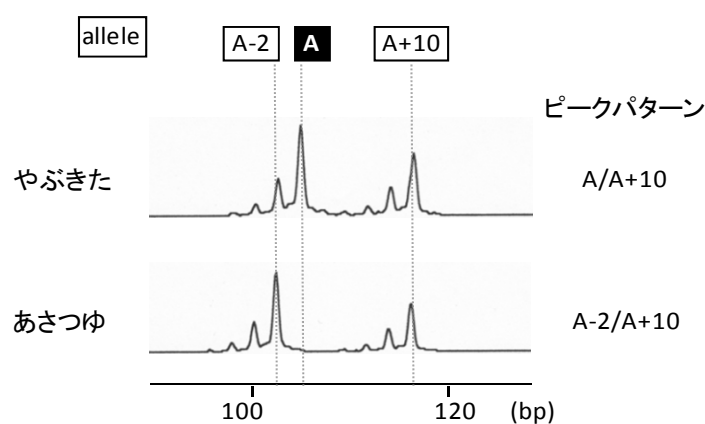


図 13 SSR マーカーによる多型解析

シーケンサーのソフトウェアにより算出されるフラグメントサイズは変動するため、基準ピークを設定してそのフラグメントサイズを A とし、他のピークは基準ピークからの差 (整数) で表す。

メントサイズ $A+N_1$ および $A+N_2$ の 2 本のピークが検出されたことを示す。図 13 の例では、「やぶきた」では A および $A+10$ の 2 本のピークが検出されたため、ピークパターンは $A/A+10$ となり、「あさつゆ」では $A-2$ および $A+10$ の 2 本が検出され、ピークパターンは $A-2/A+10$ である。本実験に用いた 6 対の SSR 増幅用プライマーでは、TMSLA17、TMSLA55、および SSR-1 の 3 対では 1 もしくは 2 本のピークが増幅されたが、TMSLA10、TMSLA13、および TMSLA37 の 3 対では、複数の遺伝子座に由来するものと見られるピークパターンを示した。それぞれピークが短鎖側と長鎖側のグループに大別できたため、プライマー名の後に短鎖側は-S、長鎖側は-L を加えてマーカー名とし、ピークパターンを

記載した。

供試した主要日本品種 16 種は互いに異なるピークパターンを示し、識別が可能であった。各品種のピークパターンを表 8 に示した。供試した 16 品種は、TMSLA55 および SSR-1 の 2 種類に加え、TMSLA10-S, -L 以外のいずれかのマーカー 1 つの、合計 3 マーカーにより、識別が可能であった。図 14 に、表 8 を基に作成した品種識別表を示した。供試した 16 品種のうち 6 品種は、TMSLA55 のみでの同定が可能であった。

	TMSLA55	SSR-1	TMSLA17	TMSLA13-S	TMSLA13-L	TMSLA37-S	TMSLA37-L	TMSLA10-S	TMSLA10-L
1 さみどり	A+16	A	A-2/A+8	-	A-2/A	A/A+4	A-2/A+10	-	A/A+4
2 やまなみ	A+16	A	A-4/A-2	A/A+8	A-10/A-8/A-4/A+2	A/A+4/A+14	A-2/A+6/A+8	A-2	A/A+4
3 さやまみどり	A+16	A	A+8/A+10	A+8	A	A/A+14	A/A+6	-	A/A+4/A+10
4 おおいわせ	A+20	A/A+19	A+8/A+10	A	A-10/A	A/A+14	A+4/A+15	A-2/A	A/A+4
5 あさつゆ	A/A+18	A+9	A-2/A+10	A/A+12	A-2	A/A+4/A+14	A+4/A+13	A-2	A/A+2
6 おくみどり	A/A+18	A/A+9	A+10	A+12	A-10/A/A+2	A/A+10	A	A	A
7 さやまかおり	A/A+18	A+9/A+10	A-4/A	A+8	A-2/A	A/A+4	A	A-2/A	A/A+2/A+4
8 ゆたかみどり	A/A+18	A+9/A+11	A-6/A+10	A	A-2/A+2	A/A+6/A+14	A+4/A+13	A-2/A	A/A+6
9 やぶきた	A/A+20	A/A+9	A/A+10	-	A	A/A+14	A/A+6	A	A/A+4
10 おくひかり	A/A+22	A/A+12	A-4/A+10	A	A-10/A	A/A+6	A/A+17	A	A/A+4
11 ベにふうき	A+14/A+18	A+9/A+11	A-4/A+14	A-2/A+2	A-10/A-8/A-4/A	A/A+4/A+10	A+4	A-2	A+4
12 やまとみどり	A+16/A+20	A/A+9	A-4	A	A-10/A	A/A+4	A-2/A+4/A+15	-	A/A+4
13 さえみどり	A+18/A+20	A+9	A+10	A+12	A-2/A	A/A+14	A	A-2/A	A/A+4
14 やまかい	A+18/A+20	A+9	A+4/A+10	-	A/A+2	A	A-6/A	A-2/A	A/A+4
15 かなやみどり	A+18/A+20	A+1/A+9	A-2/A+10	A/A+8	A	A/A+14	A/A+6	A-2/A	A
16 めいりよく	A+20/A+28	A+9	A-6/A+10	A+8	A	A/A+14	A+6	A-2/A	A/A+4

図 14 チャ由来の SSR マーカーを用いた国産主要品種 16 種の識別

左端の TMSLA55 から順に各マーカーのピークパターン毎にグループ分けをしていき、品種が同定可能となった位置を水色でマーキングした。最少で 3 つの SSR マーカーにより、供試した 16 品種は識別が可能であった。

Ujihara *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20 (2009)より許可を受けて転載（改変済み）。

©2009 公益社団法人日本農芸化学会

表 8 主要な国産品種の SSR マーカーによるタイピング

品種	TMSLA10-S	TMSLA10-L	TMSLA13-S	TMALS13-L	TMSLA17	TMSLA37-S	TMSLA37-L	TMSLA55	SSR-1
やぶきた	A	A/A+4	— ^a	A	A/A+10	A/A+14	A/A+6	A/A+20	A/A+9
ゆたかみどり	A-2/A	A/A+6	A	A-2/A+2	A-6/A+10	A/A+6/A+14	A+4/A+13	A/A+18	A+9/A+11
かなやみどり	A-2/A	A	A/A+8	A	A-2/A+10	A/A+14	A/A+6	A+18/A+20	A+1/A+9
さやまかおり	A-2/A	A/A+2/A+4	A+8	A-2/A	A-4/A	A/A+4	A	A/A+18	A+9/A+10
おくみどり	A	A	A+12	A-10/A/A+2	A+10	A/A+10	A	A/A+18	A/A+19
あさつゆ	A-2	A/A+2	A/A+12	A-2	A-2/A+10	A/A+4/A+14	A+4/A+13	A/A+18	A+9
やまかい	A-2/A	A/A+4	—	A/A+2	A+4/A+10	A	A-6/A	A+18/A+20	A+9
やまとみどり	—	A/A+4	A	A-10/A	A-4	A/A+4	A-2/A+4/A+15	A+16/A+20	A/A+9
おおいわせ	A-2/A	A/A+4	A	A-10/A	A+8/A+10	A/A+14	A+4/A+15	A+20	A/A+19
さやまみどり	—	A/A+4/A+10	A+8	A	A+8/A+10	A/A+14	A/A+6	A+16	A
めいりよく	A-2/A	A/A+4	A+8	A	A-6/A+10	A/A+14	A+6	A+20/A+28	A+9
おくひかり	A	A/A+4	A	A-10/A	A-4/A+10	A/A+6	A/A+17	A/A+22	A/A+12
さえみどり	A-2/A	A/A+4	A+12	A-2/A	A+10	A/A+14	A	A+18/A+20	A+9
さみどり	—	A/A+4	—	A-2/A	A-2/A+8	A/A+4	A-2/A+10	A+16	A
やまなみ	A-2	A/A+4	A/A+8	A-10/A-8/A-2/A+2	A-4/A-2	A/A+4/A+14	A-2/A+6/A+8	A+16	A
べにふうき	A-2	A+4	A-2/A+2	A-10/A-8/A-4/A	A-4/A+14	A/A+4/A+10	A+4	A+14/A+18	A+9/A+11
No. of alleles	2	5	5	6	8	5	10	7	7
A (bp)	95.97 ^b	105.26 ^b	86.90 ^c	161.67 ^b	107.42 ^b	110.49 ^b	152.53 ^b	83.78 ^b	117.80 ^b

^a 増幅せず。

^b GeneScan ソフトウェアにより算出された「やぶきた」のフラグメントサイズ。複数のフラグメントが検出された場合には短い方のフラグメントを用いた。

^c 「ゆたかみどり」のフラグメントサイズ。

Ujihara *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20 (2009)より許可を受けて転載。

©2009 公益社団法人日本農芸化学会

2-1b リーフ茶の品種識別への応用

続いて、これらの SSR マーカーを用いてリーフ茶の品種識別が可能であることを確認するため、リーフ茶より単離した DNA について、これらのマーカーによるピークパターンをチャ新鮮葉のものと比較した。「やぶきた」、「ゆたかみどり」、「さやまかおり」、「さえみどり」、「めいりよく」、「かなやみどり」、「おくみどり」、「おくひかり」、「おおいわせ」のリーフ茶を供試した。リーフ茶由来の DNA では、新鮮葉由来 DNA のピークパターンと一致することが確認され（図 15）、これらの SSR マーカーはリーフ茶の品種識別にも応用可能であった。

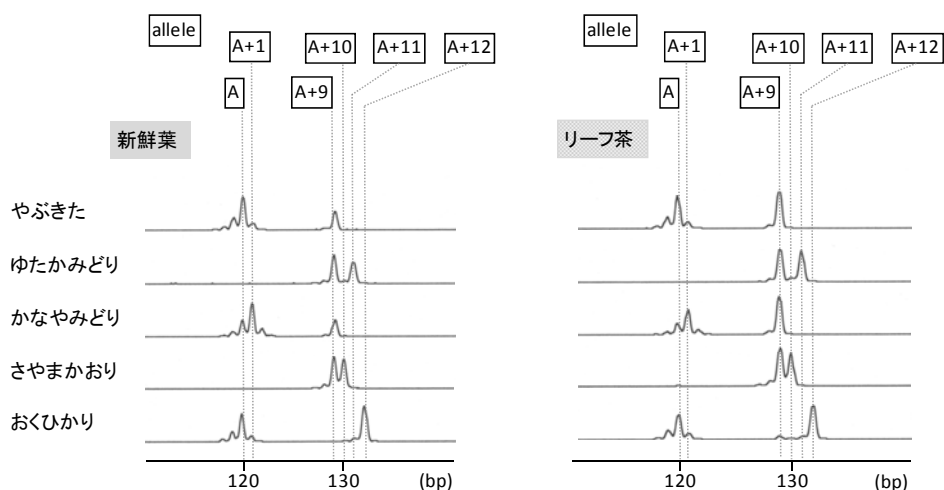


図 15 新鮮葉およびリーフ茶より単離した DNA での SSR マーカーピークパターンの比較

5 品種（やぶきた、ゆたかみどり、かなやみどり、さやまかおり、おくひかり）のピークパターンを示す。

Ujihara *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20 (2009)より許可を受けて転載。

©2009 公益社団法人日本農芸化学会

2-1c 中国品種のタイピング

SSR マーカーでは、リーフ茶を試料としても SSR マーカーによる品種識別が可能であり、また 1 マーカー当たり検出されるピーク数 (allele 数) が多く、検出能力が高いことから、日本に輸入された外国産緑茶の検出に利用可能なのではと考え、検討を行うこととした。中国産・韓国産チャと日本産チャの RFLP 解析では、日本産チャの遺伝的多様性が低かったのに対し、中国産・韓国産チャでは日本産チャにはないバンドが検出されるなど多様性が高かったことから⁸⁶⁾、SSR においても、外国産チャは日本産チャに比べ多様な遺伝子型を示すこと、日本産チャが保有しない allele を保有することが期待できたためである。

2010 年度に日本へ輸入された緑茶は 5.93×10^3 トンであるが、輸入元としては中国が 5.31×10^3 トンで約 90% を占めている³³⁾。また、中国からの輸入緑茶の品種構成を見ると、70% を「鳩坑種」が占め、続く「福雲」が 7~8% を占めるとされる (三井農林 田中氏、私信)。そこでこれら 2 品種を入手し、SSR マーカーのピークパターンを確認した。中国における茶品種には、日本の品種と同様に挿し木によるクローン増殖が行われる無性系品種と、実生による増殖が行われる有性系品種とが存在する。供試した 2 品種のうち、「福雲」は無性系品種であるが、「鳩坑種」は有性系品種である⁸⁷⁾。チャは他殖性植物であるため、「鳩坑種」は、それぞれ遺伝子型が異なる個体群であることが予測された。そこで、「鳩坑種」については、入手したリーフ茶の分析に先立ち、静岡県農林技術研究所茶業研究センターにおいて遺伝資源として栽培されている「鳩坑種」11 個体の新鮮葉を採取し、分析を行った。「福雲」はリーフ茶について分析を行った。主要日本品種と同様に 9 つの SSR マーカーについてピークパターンを確認した結果を表 9 に示した。「福雲」リーフ茶については、複数の茶葉をサンプリングし個別に分析したが、いずれも同一のピークパターンを示したため、確かにクローン品種であると確認された。また、日本品種とは明確に識別が可能であった。一方「鳩坑種」では、実験に用いた 11 個体のピークパターンは 10 種類で、2 個体のパターンが一致した他はすべての個体が異なるパターンを示した。パターンの一致

表 9 中国産品種「福雲」および「鳩坑種」の SSR マーカーによるタイピング

品種	TMSLA10-S	TMSLA10-L	TMSLA13-S	TMALS13-L	TMSLA17	TMSLA37-S	TMSLA37-L	TMSLA55	SSR-1
福雲	A	A+6/A+8	A/A+50	A/A+2	A-14/A+60	A	A+4/A+12	A-2	A/A+19
鳩坑種 1	A-2	A/A+4	A/A+14	A+2	A-10/A-4	A/A+4	A+4/A+12	A-2	A+10/A+19
鳩坑種 2	A	A/A+4	A-4/A+14	A-4/A+2	A-4/A/A+12	A/A+8/A+12	A+6/A+10	A-2/A+4	A+12/A+16/A+19
鳩坑種 3	-	A+2/A+4/A+6/A+8	A-6/A	A-4	A	A/A+4	A+10	A-6/A-2	A+16/A+19
鳩坑種 4	A-2/A	A/A+4	A+6/A+12	A-6/A+2	A-10/A+2	A/A+4/A+6	A+4/A+12	A-2	A+9/A+19
鳩坑種 5	-	A/A+4/A+6/A+10	A-2/A+6	A+2	A-10/A+2	A/A+4/A+8	A+4/A+12/A+15	A-6/A-2	A+10/A+19
鳩坑種 6	A	A+2/A+4	A-4/A-2	A-4/A-13	A+10	A/A+4/A+6	A+6	A-4/A	A+7/A+12
鳩坑種 7	A	A+6/A/10	A+2	A-2	A-10/A-4	A/A+4/A+6	A+4/A+12	A-4	A+7/A+19
鳩坑種 8	A-2	A+4/A+10	A-2/A+12	A-13/A-2	A-10/A+8	A/A+8/A+12	A-2	A-4/A-2	A+12
鳩坑種 9	A-2	A/A+4/A+6	A/A+12	A-13/A-6/A-4	A+8	A/A+4/A+10/A+14	-	A-2	A+9/A+19
鳩坑種 10	A	A+2/A+4	A/A+12	A-13/A+2	A+8	A/A+4/A+10	A-4	A-6/A-2	A+9/A+28 (U ^a)
鳩坑種 11	A-2	A/A+4	A/A+14	A+2	A-10/A-4	A/A+4	A+4/A+12	A-2	A+10/A+19
No. of alleles	2	6	7	6	9	7	7	5	8

^a ピーク A+28 (U)は「鳩坑種」に特異的。

Ujihara *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20 (2009)より許可を受けて転載。

©2009 公益社団法人日本農芸化学会

表 10 「鳩坑種」特異的ピークの有無を確認した日本品種

品種名							
やぶきた	ゆたかみどり	かなやみどり	さやまかおり	おくみどり	あさつゆ	やまかい	やまとみどり
おおいわせ	さやまみどり	めいりよく	おくひかり	さえみどり	さみどり	やまなみ	べにふうき
あさぎり	あさひ	べにひかり	べにほまれ	藤かおり	ふじみどり	ふくみどり	ふうしゅん
ごこう	はつもみじ	ひめみどり	ほくめい	いなぐち	からべに	こまかげ	香駿
くらさわ	くりたわせ	まきのほらわせ	摩利子	みなみかおり	みなみさやか	むさしかおり	おくむさし
おくゆたか	おおむね	りょうふう	さきみどり	さわみずか	しゅんめい	静・印雑 131	するがわせ
ただにしき	たかちほ	たまみどり	とよか	うじひかり	やえほ	山の息吹	枕 18 号

した 2 個体は、サンプリング時の混同によるものであるのか、自由に交配が行われたために偶然に一致したものであるのかは明らかではない。マーカーの 1 つである SSR-1 では、「鳩坑種」の中に、他の個体から離れた鎖長のピークを有する個体が存在した。このピークは、主要な日本品種および日本在来チャより選抜された品種 56 種（表 10）、中国品種「福雲」では見出されなかったことから、本実験に用いた品種の中では「鳩坑種」に特異的なものであると判断された。このピークについて、浙江省産「鳩坑種」リーフ茶より茶葉を個別にサンプリングして存在確認をしたところ、複数の茶葉において検出され、またこのピークを含んだピークパターンとしては 9 パターンが検出されたことから（図 16）、このピ

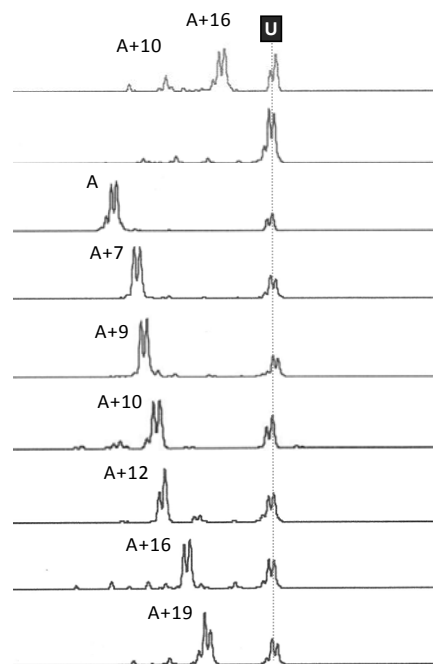


図 16 浙江省産「鳩坑種」リーフ茶のうち特異的ピーク U を有するピークパターン

特異的ピーク U を有する 9 パターンが検出された。

ークを与える allele が「鳩坑種」の集団内に保有されているものと考えられた（表 11）。こ

表 11 浙江省産「鳩坑種」リーフ茶における特異的ピーク U の検出数

	2003 年産	2004 年産	
特異的ピークあり	16	15	
なし	31	31	
合計	47	46	Ujihara <i>et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 73 : 15-20 (2009)
特異的ピークの含有割合(%)	34	33	より許可を受けて転載（改変済み）。 ©2009 公益社団法人日本農芸化学会

のピークは、他の品種で検出されるピークとは最短でも 20 bp 程度鎖長が異なり、識別が容易であることから、ブレンドが行われた試料において「鳩坑種」の検出マーカーとしての利用が可能であることが期待された。実験的に調製した、日本品種「やぶきた」と「鳩坑種」とのブレンド試料においては、テンプレート量を通常の SSR の多型解析の場合より増やす必要はあったものの、「やぶきた」に「鳩坑種」が 5 %ブレンドされた試料においても、「鳩坑種」特異的ピークは検出可能であった（図 17）。

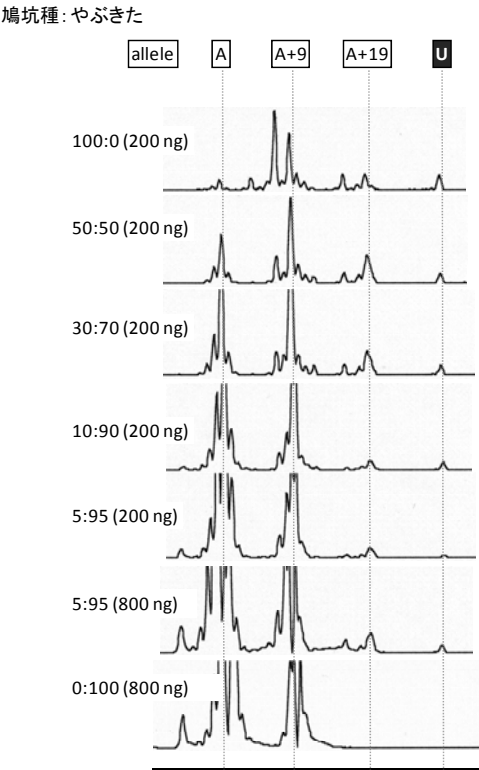


図 17 ブレンドモデルにおける「鳩坑種」特異的ピーク U の検出

「鳩坑種」が試料中に 10%以上ブレンドされた場合、200 ng の DNA を PCR に用いることで特異的ピーク U が検出できたが、「鳩坑種」が 5%の場合には、PCR に用いる DNA を 800 ng に増やす必要があった。

Ujihara *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 15-20
(2009)より許可を受けて転載。
©2009 公益社団法人日本農芸化学会

2-1d 緑茶浸出液の品種識別への応用

次に、緑茶浸出液より単離した DNA について、これらのマーカーによるピークパターンを確認した。野菜茶業研究所金谷拠点で製造された 6 種類の品種茶各 5.00 g より、500 mL の浸出液を調製し、第 1 章 1-2 節の方法を用いて DNA を単離し供試した。大部分のマーカーで、浸出液由来 DNA は新鮮葉由来 DNA と同様のピークパターンを示したが（図 18）、

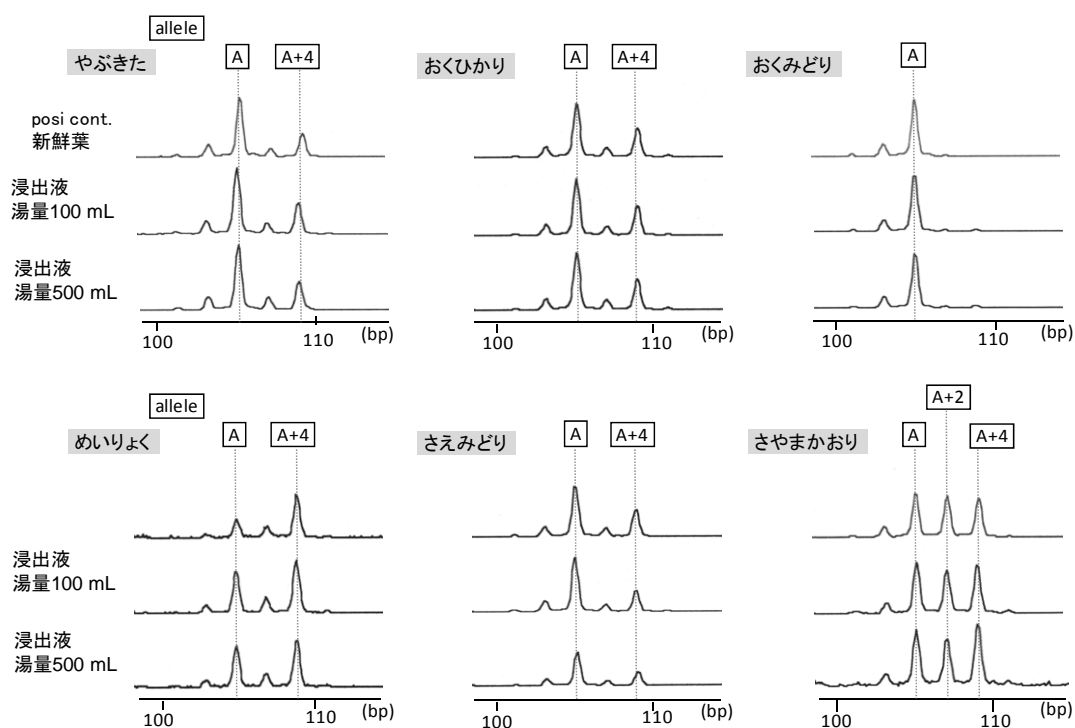


図 18 緑茶浸出液および新鮮葉より単離した DNA での SSR マーカーピークパターンが一致した例

6 品種（やぶきた、おくひかり、おくみどり、めいりよく、さえみどり、さやまかおり、）の TMSLA-10-L におけるピークパターンを代表として示す。

Ujihara *et al. Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。
©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

一部のマーカーでは、浸出液由来 DNA で非特異的なピークの増幅により、ピークパターンが新鮮葉と一致しない試料があった（図 19）。TMSLA13-S において、「やぶきた」新鮮葉では増幅が見られないが、浸出液では A+8/A+24 の 2 本のピークが増幅した。また TMSLA55 においては、「めいりよく」新鮮葉のピークパターンは A+20/A+28 であるが、浸出液では非特異的な増幅によりピーク A が生じ、ピークパターンが A/ A+20/A+28 となっている。

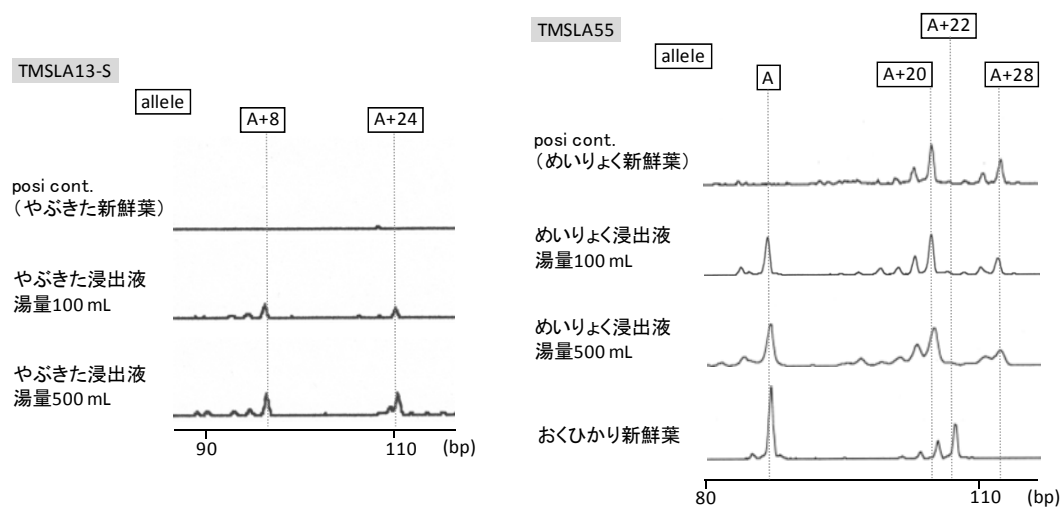


図 19 緑茶浸出液および新鮮葉より単離した DNA での SSR マーカーピークパターンが一致しなかった例

TMSLA13-S では「やぶきた」新鮮葉はピークが見られないが、浸出液では A+8/A+24 の 2 ピークが生じている。TMSLA55 では「めいりよく」新鮮葉のピークパターンは A+20/A+28 だが、浸出液では本来検出されない A が生じている。

Ujihara et al. *Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)より許可を受けて転載。
©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

一般に作物などの生体組織を出発材料として SSR マーカーによるタイピングを行う場合、鋳型 DNA は 10 ng 程度と少量であることが多い。本実験において採用した鋳型 DNA 量は 100 ng であり、一般的な鋳型量と比べると多いが、緑茶浸出液由来の DNA の場合、10 ng ではフラグメントの増幅が見られず、100 ng もしくはそれ以上まで増量しないとフラグメント増幅が確認できない試料が多かった。PCR を用いたゲノム解析で非特異的増幅

が起こる場合、鋳型 DNA 量が適切でない場合があり、適宜増減させることで解消される場合があることが経験的に知られている。本実験においては、増量は行わず、「やぶきた」および「めいりよく」浸出液由来の DNA を希釈し、1 ng、10 ng、50 ng をそれぞれ用いて再度 TMSLA13-S（やぶきた）および TMSLA55（めいりよく）の増幅を行った。いずれも 1 ng の鋳型量では増幅が見られず、増幅が確認できた 10 ng および 50 ng の鋳型量では、100 ng と同様に非特異的な増幅が起こっていた。また、増幅に用いる DNA polymerase を *TaKaRa ExTaq* に変えたところ、無秩序な非特異的増幅によりピークパターンそのものが判別不能な状態であった。このことから、SSR マーカーは、飲料等緑茶浸出液の品種識別に用いるには信頼性に問題があることが明らかとなった。

また、本実験で使用した SSR マーカーでは、1 マーカーあたり 2~10 個の allele が検出されたが、検出されたピークには品種間で極端な鎖長の違いはなく、ブレンド試料において原料品種を個別に識別することは困難であると考えられた。一例として、図 20 に、マーカー TMSLA10-L における市販緑茶飲料のピークパターンを示した。このマーカーでは、「ゆたかみどり」のみが特異的なピーク（A+6）を有する。多数の原料品種がブレンドされた市

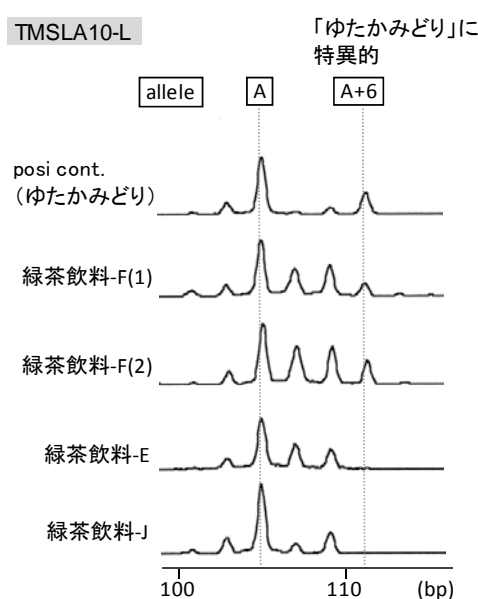


図 20 一部の市販緑茶飲料で検出された「ゆたかみどり」特異的ピーク

F 社の緑茶飲料では、「ゆたかみどり」特異的ピーク A+6 が検出され、この品種を原料の一つに使用していることが推測できる。他のピークについては、該当する品種が複数あるため同定は不可能である。

Ujihara et al. *Food Sci. Technol. Res.* **18**: 209-217 (2012)
より許可を受けて転載。
©2012 公益社団法人日本食品科学工学会

販緑茶飲料のピークパターンを確認すると、一部の試料ではこのピークが検出され、原料品種の 1 つとして「ゆたかみどり」を使用していることが推測されたが、その他のピークについてはどの品種に由来するものであるのかの判別が不可能である。これは他の SSR マーカーについても同様で、ブレンド試料中の個別の品種の識別は、本研究に用いた SSR マーカーでは不可能であった。この問題については、本実験に用いたものの他に、より多型性の高い SSR マーカーを探索することが解決法の 1 つであるが、前述のように、市販緑茶飲料では SSR のピークパターン自体の正確な判定が不可能であることから、品種識別の手法については SSR 以外の手段を検討する必要があると考えられた。

以上より、SSR マーカーは、チャ新鮮葉およびリーフ茶の品種識別に関しては有用であり、また外国産緑茶と日本産緑茶の識別にも利用が可能であるが、市販緑茶飲料等緑茶浸出液の品種識別には使用不可能であり、別の識別手法を用いる必要があるという結論に至った。

2-2 新規 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)

マーカーの開発

前項において、PET 飲料等緑茶浸出液の品種識別のためには手法の検討が必要であることが明らかとなった。手法の候補としては、single nucleotide polymorphism (SNP) マーカーが有望であろうと考えられた。SNP は、ゲノム上に生じた 1 塩基の配列の違いであるが、SNP マーカーでは、対立遺伝子を個別にマーキングして検出することが可能であり⁸⁸⁾、また、複数の個体に由来する DNA が混在する条件において、対立遺伝子の含有量のある程度推計可能であるため^{89,90)}、ブレンドが行われた状態の緑茶浸出液についても、SNP マーカーによる原料品種の同定が可能であることが期待できるためである。しかし、現在、国内で栽培されている日本品種は少なくとも 60 品種に上り¹³⁾、シーケンス解析による直接の SNP 探索は非常にコストがかかること、またそのようにして SNP マーカーの構築を行ったとしても、品種識別を行うにあたっては、SNP を含む広い領域のシーケンシングではなく、SNaPshot[®]法 (Applied Biosystems) や TAQMAN[®]法 (Applied Biosystems) といった検出法⁸⁸⁾を用いることが必要であるが、これらの検出系を構築するためには設備、コストの両面から条件検討が不可能であったことから、cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーに着目した。CAPS は、対象となる PCR 断片内に存在する制限酵素認識部位に生じた突然変異を、PCR 断片の制限酵素処理、電気泳動による断片パターンの確認により検出する DNA マーカーであり、一般に、マーカー断片は 200~1000 bp 程度となるように増幅用プライマーを設計し、断片パターンの検出にはアガロースゲル電気泳動が用いられる。前項において検討した SSR に比べ、CAPS で検出される allele は遺伝子座あたり、amplicon length polymorphism (ALP) が存在する場合であっても 3 種類程度であり、DNA マーカーとしての多型検出能力は劣っているが、CAPS マーカーには、single

nucleotide polymorphism (SNP) マーカーへの展開が可能であるという大きな利点がある。SNP は、ゲノム上に生じた 1 塩基の配列の違いであるが、CAPS も、制限酵素認識部位に生じた SNP を断片パターンの違いの形で検出しているものである。本研究では、まず開発コストの比較的低い CAPS マーカーを開発し、品種識別に応用可能であることを確認することとした。

マーカー開発には、別途解析が進められていたチャ幼根由来の EST 情報を利用しての遺伝マップ作成の一端を担うため、この EST より無作為に選抜された 26 種類と、チャでクローニングされたアンモニウムトランスポーターおよびグルタミン酸合成酵素 5 種類の、合計 31 種類の断片と、4 塩基 (8 種類) または 5 塩基 (5 種類) を認識する制限酵素 13 種類を使用した。植物サンプルとしては、商業品種とその親を含む 14 種類のチャ、およびツバキ (*Camellia*) 属のヤブツバキ (*C. japonica* L.) とキンカチャ [*C. chrythanta* (Hu) Tsuyama] の合計 16 種類を使用した。

結果と考察

供試した 31 種類全てのプライマー対でキンカチャの増幅断片は得られなかった。EST の 26 プライマー対のうち 8 対では、キンカチャ以外のサンプルでも増幅産物が得られなかった。増幅産物の得られた 18 対のうち 5 対では、大部分の制限酵素で多型が検出されたが、増幅産物自体が約 2.5~4.0 kb と、EST の塩基配列より予測される増幅断片長 (約 500 bp) よりも大幅に長かった。このような長い断片では、PCR による増幅が困難であり、また制限酵素処理後の断片パターンが複雑になり判別が困難であることから、マーカーとしてカウントしないこととした。アンモニウムトランスポーターおよびグルタミン酸合成酵素遺伝子より設計した 5 組のプライマー対では、アンモニウムトランスポーターの 1 つ (AMT1) を対象に設計されたプライマーでヤブツバキの増幅産物が得られなかった。チャで多型が検出された断片と制限酵素の組み合わせ 30 組のうち、断片パターンが明確に識別可能であ

表 12 新たに開発した CAPS マーカー

断片 (accession number)	遺伝子名または annotation (遺伝子名, 植物, accession number, E-value)		primer sequence (5'-3')	アニーリング 温度(°C)	増幅断片長 (bp)	制限酵素
45	AMT1 ^a (AB117640)	Forward	CCAGCGCTTCCAACACAAACC	58	1358	<i>Dde</i> I
		Reverse	CCTTCTGAAAGTGGTTTGAACAGAGC		1076	<i>Rsa</i> I
	AMT2 (AB114913)	Forward	ACCTCCGGCGCCCTCTTGTT	58	1014	<i>Alw</i> 26 I
		Reverse	GCTGATACGTAGGAAGTTTGACTCTG			
	GS1A (AB115183)	Forward	TTTGAGGTCATCAAAAAGGCCATT	58	919	<i>Alw</i> 26 I
		Reverse	ACACAAAGGTTGGGTTGGGATTATG			<i>Rsa</i> I
	GS1C ^a (AB115184)	Forward	TGGTGAAGGCAACGAGCGTC	58	1320 ^c	<i>Hinf</i> I
		Reverse	AAAGATGATAATAAAATTAACCCCACCATATTGT		1140	<i>Rsa</i> I
					1095	
					1073	
					874	
	GS2B ^a (AB117934)	Forward	GCTTATGGAGAAGGCAATGAGCG	58	1420	<i>Hinf</i> I
		Reverse	AACAGCCAAACATACCATGATGAATTTAC		1142	<i>Taq</i> I
	3B02S ^b (FS951215)	Forward	ACCCACAATCAACTCATTCTCATT	60	682	<i>Hae</i> III
		Reverse	TACTTGGTTCAAGCATAAACATCAGA			
	C5S22 ^b (FS951237)	Forward	CCTTCTCTCCTCACCACCTT	60	558	<i>Dde</i> I
		Reverse	AAAATTTAAGGTCGAAATTTTTCG			<i>Msp</i> I
	C10S38 ^b (FS 951245)	Forward	CAGCCAGTGACCATTTTTCAGC	60	551	<i>Hinf</i> I
		Reverse	TTGAGTGGATCCCCAACAAAT			<i>Msp</i> I
	E3S12 ^b (FS951271)	Forward	TCATTTTGGTTTTCATGCTTCA	60	556	<i>Alw</i> 26 I
		Reverse	TTGATGTTGAGAACTATAAGTGCAA			<i>Hinf</i> I

^a amplicon length polymorphism (ALP)を示す。 ^b EST に由来。 ^c マーカー開発に用いた「枕 1 号」でのみ検出される。

Reprinted (adapted) with permission from Ujihara et al. *J. agric. Food Chem.* **59**: 1557-1564 (2011).

Copyright (2011) American Chemical Society.

った 16 組を、品種識別用 CAPS マーカーとした。各マーカーについて表 12 にまとめた。続いて、これらの CAPS マーカーを用いて日本産品種のタイピングを行った。タイピングには、マーカー開発に使用した品種、系統を加え、合計 67 品種を供試した。各マーカーで検出された断片パターンを表 13 に示した。シーケンス解析により、GS1C/*Hinf* I および GS1C/*Rsa* I の 2 マーカーでは 7 種類、GS2B/*Taq* I では 5 種類の断片パターンが存在することが明らかとなった。それぞれ小さな挿入／欠損により増幅断片長が異なっていたが、制限酵素処理後の断片では、30～40 bp 程度の微妙な断片長の違いを正確に判別することは不可能であり、実際の品種識別では、アガロースゲルにより識別不可能な断片パターンについては、全てをまとめて 1 タイプのパターンとして扱うのが現実的である。表 13 には、シーケンス解析に基づく本来の断片パターンの他、識別不可能なパターンをまとめて命名した実用的な断片パターンを記載した。本研究において、以後のタイピングはこの実用的な断片パターンを用いて行った。また、開発したマーカーのうち、断片 GS2B を用いる 2 種のマーカー (GS2B/*Hinf* I、GS2B/*Taq* I) では、同一の断片パターンを有する品種間で、制限酵素断片の中にアガロースゲル電気泳動で断片長が異なるものが見出された。図 21 において矢印で示したバンドの断片長がサンプル毎に異なっている。シーケンス解析の結果、この部分には(TC)を繰り返し単位とする SSR が存在し、断片長の違いはこの SSR のリピート数の変異に基づくものであることが明らかとなった。アガロースゲル電気泳動によって、SSR を含む断片の長さを正確に判別することは不可能であるため、SSR による断片長の違いは考慮に入れないこととし、制限酵素認識部位での変異に基づく断片パターンの違いのみを記録した。

表 13 開発した CAPS マーカーで検出される多型

	増幅 断片長 (bp)	制限酵素断片 (bp) ^a	断片タイプ	accession number
AMT1/ <i>Dde</i> I	1358	800 + 558	A	AB597260
	1076	1076	B	
	1076	800 + 276	C	
AMT1/ <i>Rsa</i> I	1358	437+413+116+91+74+70 +66+62+29	A	AB597261
	1076	528 + 449 + 70 + 29	B	
	1076	449 + 437 + 91 + 70 + 29	C	
AMT2/ <i>A/w</i> 26 I	1014	931 + 83	A	AB597261
		719 + 212 + 83	B	
GS1A/ <i>A/w</i> 26 I	919	495 + 317 + 87 + 20	A	AB597261
		495 + 174 + 143 + 87 + 20	B	
GS1A/ <i>Rsa</i> I	919	919	A	AB597261
		627 + 292	B	
GS1C/ <i>Hinf</i> I	1320	755 + 271 + 188 + 74 + 32	A ^b	AB597264
	1140	755 + 197 + 188	B (B2) ^c	
		755 + 197 + 188	C (B2) ^c	
	1095	710 + 197 + 188	D (B2) ^c	
		548 + 197 + 188 + 159	E	
	1073	755 + 164 + 154	F (B2) ^c	
	874	497 + 189 + 188	G	
GS1C/ <i>Rsa</i> I	1320	609 + 578 + 133	A ^b	AB597264
	1140	1007+133	B	
		578 + 429 + 133	C (C2) ^c	
	1095	579 + 429 + 31 + 56	D (C2) ^c	
		576 + 429 + 31 + 56	E (C2) ^c	
	1073	578 + 362 + 133	F	
	874	753 + 121	G	
GS2B/ <i>Hinf</i> I	1420	1252 + 168	A	AB597262
	1142	974 + 168	B	
		830 + 168 + 142	C	
		674 + 299 + 170	D	
GS2B/ <i>Taq</i> I	1420	870 + 550	A	AB597262
	1142	1143	B	
		612 + 537	C (C2) ^c	
		597 + 545	D (C2) ^c	
		545 + 389 + 206	E	
3B02S/ <i>Hae</i> III	682	682	A	AB597263
		612 + 70	B	
C5S22/ <i>Dde</i> I	558	558	A	AB597263
		291 + 267	B	
C5S22/ <i>Msp</i> I	558	491 + 67	A	AB597263
		372 + 119 + 67	B	
C10S38/ <i>Hinf</i> I	551	551	A	AB597263
		434 + 117	B	
C10S38/ <i>Msp</i> I	551	551	A	AB597263
		497 + 54	B	
E3S12/ <i>A/w</i> 26 I	564	446 + 118	A	AB597263
		385 + 118 + 61	B	
E3S12/ <i>Hinf</i> I	564	298 + 196 + 70	A	AB597263
		196 + 149 + 149 + 70	B	

^a 数 bp 程度の挿入／欠損により増幅断片長に一致しない場合がある。^b 日本品種では検出されない。^c アガロースゲル電気泳動ではタイプの識別が不可能であるため、一つのタイプとした。Reprinted (adapted) with permission from Ujihara et al. *J. agric. Food Chem.* **59**: 1557-1564 (2011).

Copyright (2011) American Chemical Society.

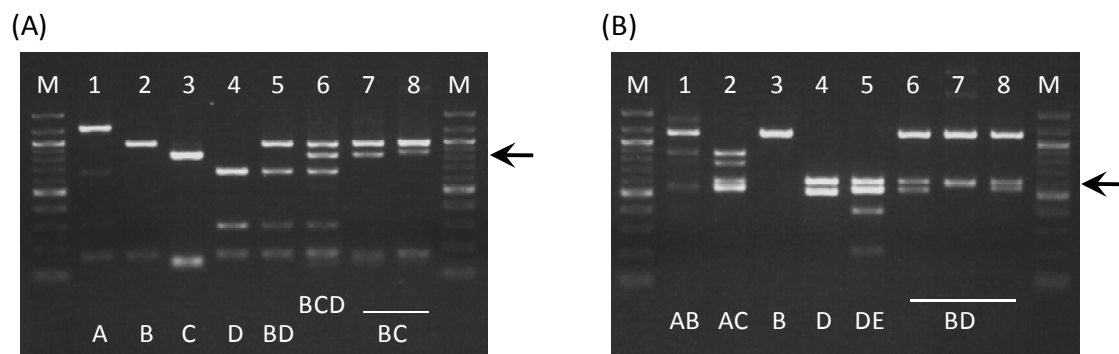


図 21 GS2B フラグメントを用いる 2 種類のマーカー、GS2B/*Hinf*I および GS2B/*Taq*I の断片パターン

(A) GS2B/*Hinf*I の断片パターン

M : 100 bp DNA Ladder (NEB)、1 : 断片タイプ A、2 : 断片タイプ B、3 : 断片タイプ C、4 : 断片タイプ D、5 : 断片タイプ B と D の組み合わせ、6 : 断片タイプ B, C, および D の組み合わせ、7 および 8 : 断片タイプ B と C の組み合わせ。

(B) GS2B/*Taq*I の断片パターン

M : 100 bp DNA Ladder (NEB)、1 : 断片タイプ A と B の組み合わせ、2 : 断片タイプ A と C の組み合わせ、3 : 断片タイプ B、4 : 断片タイプ D、5 : 断片タイプ D と E の組み合わせ、6, 7 および 8 : 断片タイプ B と D の組み合わせ。

両マーカーとも、配列内に存在する SSR により、断片タイプ B および C でバンドのサイズに変動が見られる（矢印）が、アガロースゲル電気泳動による正確な識別は不可能であるため、区別はしないこととした。

Reprinted (adapted) with permission from Ujihara *et al.* *J. agric. Food Chem.* **59**: 1557-1564 (2011).

Copyright (2011) American Chemical Society.

供試した日本品種 67 種の 16 マーカーでのタイピング結果を表 14 に示した。日本の品種は、「まきのはらわせ (3 倍体)」を除き 2 倍体であり、通常 1 遺伝子座を対象とした CAPS マーカーで検出される断片パターンは 1 もしくは 2 種類であるが、マーカー GS2B/*Hinf*I においては、3 種類のパターンが検出される品種があった (表 14、図 21(A))。これは、*gs2B* 遺伝子自身に複数のコピーが存在するか、もしくは偽遺伝子などの形で、本実験に用いた増幅用プライマー対がアニールする複数の部位がチャゲノム上に存在するためであろうと考えられる。

表 14 国産品種のタイピング結果

	AMT1 /DdeI	AMT1 /RsaI	AMT2 /Alw26I	GS1A /Alw26I	GS1A /RsaI	GS1C /HinfI	GS1C /RsaI	GS2B /HinfI	GS2B /TaqI	3B02S /HaeIII	C5S22 /DdeI	C5S22 /MspI	C10S38 /HinfI	C10S38 /MspI	E3S12 /Alw26I	E3S12 /HinfI
あさぎり	B	BC	A	AB	B	B2	C2	BC	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
あさひ	BC	BC	A	A	B	B2E	C2	B	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
あさのか	C	BC	A	AB	A	B2E	C2	BCD	BC2	A	AB	B	B	A	B	A
あさつゆ	AC	AC	A	AB	B	B2	C2F	BC	C2	A	B	AB	B	A	B	A
べにふじ	BC	BC	A	AB	B	B2	C2	BC	C2	A	AB	B	B	AB	B	A
べにふうき	BC	BC	A	AB	B	B2	C2	BC	C2	A	A	B	B	AB	AB	A
べにひかり	C	BC	A	AB	B	B2E	C2	BD	C2E	A	AB	B	AB	A	B	A
べにほまれ	BC	BC	A	AB	B	B2	C2	B	BC2	A	A	B	B	B	B	A
藤かおり	C	C	AB	AB	B	B2E	BC2	BCD	BC2	A	A	B	B	AB	AB	A
ふじみどり	C	BC	A	AB	B	B2	C2F	BCD	C2E	A	B	AB	AB	A	B	A
ふくみどり	C	BC	A	AB	AB	B2E	C2	BC	C2	AC	A	B	B	A	B	A
ふうしゅん	BC	BC	A	B	B	B2	C2F	BC	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
ごこう	C	C	A	AB	AB	B2E	C2	C	C2	A	AB	B	B	A	- ^a	-
はるみどり	C	C	AB	AB	AB	B2E	C2F	B	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
はるもえぎ	BC	BC	AB	B	B	B2E	C2F	BCD	BC2	A	A	B	B	A	B	A
はつもみじ	C	C	A	AB	B	B2	C2	BCD	C2E	A	AB	B	B	AB	B	A
ひめみどり	C	BC	A	B	B	B2	F	BC	C2	A	B	A	B	A	B	A
ほくめい	BC	BC	A	AB	AB	B2	C2	BC	C2	A	A	B	B	A	B	A
いずみ	BC	BC	A	AB	B	B2E	C2	BC	BC2	A	AB	B	B	AB	B	A
かなやみどり	C	C	AB	B	B	B2E	C2F	BC	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
からべに	C	BC	A	B	AB	B2E	C2	C	C2	A	AB	AB	B	AB	B	A
こまかげ	C	BC	A	AB	B	E	C2	BC	C2	A	B	A	B	A	B	A
香駿	BC	BC	AB	AB	B	E	C2	BD	BC2	AB	A	B	B	A	B	A
くらすわ	BC	BC	A	A	AB	B2E	C2	D	B	AB	A	B	B	AB	B	A
くりたわせ	AB	AB	A	B	B	E	C2	BC	C2	A	B	A	B	AB	-	-
まきのはらわせ	BC	BC	A	AB	AB	B2E	C2F	BC	C2	A	B	A	B	A	B	A
摩利子	BC	BC	A	B	B	B2	C2	BCD	BC2	A	AB	B	B	A	B	A
めいりよく	BC	BC	AB	AB	B	B2E	C2	BC	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
みなみかおり	C	B	B	AB	B	B2E	C2	AD	AB	A	A	B	B	A	B	A
みなみさやか	BC	BC	AB	AB	B	B2E	C2F	BC	C2	A	A	B	B	A	B	AB
みねかおり	C	BC	AB	AB	AB	B2E	C2	AB	AC2	A	AB	B	B	A	B	A
みやまかおり	C	BC	A	B	B	B2E	C2	BD	BC2	A	AB	AB	B	AB	B	A
むさしかおり	C	BC	AB	A	A	B2E	C2	BCD	BC2	A	A	B	B	A	B	A

表 14 続き

	AMT1 /DdeI	AMT1 /RsaI	AMT2 /Alw26I	GS1A /Alw26I	GS1A /RsaI	GS1C /HinfI	GS1C /RsaI	GS2B /HinfI	GS2B /TaqI	3B02S /HaeIII	C3S22 /DdeI	C3S22 /MspI	C10S38 /HinfI	C10S38 /MspI	E3S12 /Alw26I	E3S12 /HinfI
なつみどり	AC	AC	A	A	AB	B2E	C2	BC	C2	A	AB	AB	B	AB	-	-
おおいわせ	BC	BC	AB	B	B	B2E	C2F	D	B	A	A	B	B	A	B	A
おくひかり	C	BC	AB	A	AB	B2E	C2	BC	C2	A	A	B	B	A	B	A
おくみどり	C	BC	A	A	AB	B2E	C2	BCD	BC2	A	A	B	B	A	B	A
おくむさし	AB	AB	A	AB	B	B2	C2	C	C2	A	A	B	B	A	B	A
おくゆたか	C	C	A	B	B	B2	C2F	BC	C2	A	B	AB	B	AB	B	A
りょうふう	C	BC	A	AB	B	B2	C2	BD	BC2	A	AB	AB	B	A	B	A
さえみどり	C	C	AB	AB	B	B2E	C2F	B	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
さいのみどり	C	C	AB	A	AB	B2E	C2	BD	B	A	A	B	B	AB	B	A
さきみどり	BC	BC	AB	B	B	B2E	C2F	BCD	BC2	A	A	B	B	A	B	A
さみどり	AC	AC	A	AB	AB	B2E	C2	BC	C2	A	A	B	B	A	B	A
さわみずか	C	C	AB	A	AB	B2E	C2F	BCD	BC2	A	AB	AB	AB	A	B	A
さやまかおり	BC	BC	AB	AB	AB	B2E	C2	B	BC2	A	A	B	B	A	B	A
さやまみどり	AB	AB	A	B	B	B2	C2	BC	C2	A	A	B	B	A	B	A
しゅんめい	C	C	A	B	B	B2	C2F	C	C2	A	AB	B	B	A	B	A
そうふう	C	BC	AB	B	B	B2E	BC2	BC	C2	A	A	B	B	AB	AB	A
するがわせ	BC	BC	AB	B	B	E	C2	AB	AC2	A	AB	B	B	A	B	A
ただにしき	BC	BC	A	AB	AB	B2	C2F	B	BC2	A	AB	AB	B	A	B	A
たかちほ	AB	AB	A	B	B	B2E	C2	C	C2	A	AB	AB	B	A	B	A
たまみどり	AC	AC	A	A	AB	B2E	C2	C	C2	A	B	A	B	A	B	A
とよか	BC	BC	A	B	B	B2E	C2	B	C2	A	A	B	B	A	B	A
つゆひかり	AC	AC	A	A	AB	B2	C2F	AB	AC2	A	B	A	B	A	B	A
うじひかり	AC	AC	A	AB	AB	B2	C2F	BC	C2	A	AB	AB	B	A	-	-
やえほ	BC	BC	A	B	B	B2	C2F	BCD	BC2	A	A	B	B	AB	B	A
やまかい	C	BC	AB	AB	B	B2E	C2	BD	BC2	A	AB	B	B	A	B	A
やまなみ	C	BC	A	AB	AB	B2	C2	BC	C2	AB	AB	AB	B	A	B	A
山の息吹	BC	BC	A	B	B	B2E	C2	BC	C2	A	A	B	B	A	B	A
やまとみどり	BC	BC	A	AB	B	B2G	C2G	BCD	BC2	A	A	B	B	AB	B	A
ゆたかみどり	C	BC	A	B	B	B2	C2	BC	C2	A	AB	B	B	AB	B	A
きら香	C	C	AB	AB	AB	E	C2	BD	BC2	A	A	B	B	A	B	A
やぶきた	C	C	AB	AB	AB	E	C2	BD	BC2	A	A	B	B	A	B	A
静 7132	C	C	A	A	AB	B2	C2	AB	AC2	A	AB	AB	B	AB	B	A
静一印雑 131	C	BC	A	AB	B	B2	BC2	C	C2	A	AB	AB	B	B	A	A
Z-1	AB	AB	A	AB	B	B2	C2	BC	C2	A	B	A	B	AB	B	A

Reprinted (adapted) with permission from Ujihara *et al. J. agric. Food Chem.* **59**: 1557-1564 (2011). Copyright (2011) American Chemical Society.

図 22 には、表 14 のタイピング結果を基に作成した国産品種の同定手順を示した。供試し

		GS2B /HinfI	GS2B /TaqI	AMT1 /DdeI	AMT1 /RsaI	AMT2 /Alw26I	GS1:1A /Alw26I	GS1:1A /RsaI	C5S22 /DdeI	C5S22 /MspI	3B02S /HaeIII	C10S38 /HinfI	C10S38 /MspI	E3S12 /Alw26I	E3S12 /HinfI	GS1C /HinfI	GS1C /RsaI
1	つゆひかり	AB	AC1	AC	AC	A	A	AB	B	A	A	B	A	B	A	B2	C2F
2	するがわせ	AB	AC1	BC	BC	AB	B	B	AB	B	A	B	A	B	A	E	C2
3	みねかおり	AB	AC1	C	BC	AB	AB	AB	AB	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
4	静7132	AB	AC1	C	C	A	A	AB	AB	AB	A	B	AB	B	A	B2	C2
5	みなみかおり	AD	AB	C	B	B	AB	B	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
6	ただにしき	B	BC1	BC	BC	A	AB	AB	AB	AB	A	B	A	B	A	B2	C2F
7	べにほまれ	B	BC1	BC	BC	A	AB	B	A	B	A	B	B	B	A	B2	C2
8	さやまかおり	B	BC1	BC	BC	AB	AB	AB	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
9	あさひ	B	C1	BC	BC	A	A	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2E	C2
10	とよか	B	C1	BC	BC	A	B	B	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
11	はるみどり	B	C1	C	C	AB	AB	AB	AB	AB	A	B	A	B	A	EB2	C2F
12	さきみどり	B	C1	C	C	AB	AB	B	AB	AB	A	B	A	B	A	EB2	C2F
13	いずみ	BC	BC1	BC	BC	A	AB	B	AB	B	A	B	AB	B	A	B2E	C2
14	Z1	BC	C1	AB	AB	A	AB	B	B	A	A	B	AB	B	A	B2	C2
15	さやまみどり	BC	C1	AB	AB	A	B	B	A	B	A	B	A	B	A	B2	C2
16	くりたわせ	BC	C1	AB	AB	A	B	B	B	A	A	B	AB	?	?	E	C2
17	なつみどり	BC	C1	AC	AC	A	A	AB	AB	AB	A	B	AB	?	?	B2E	C2
18	さみどり	BC	C1	AC	AC	A	AB	AB	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
19	うじひかり	BC	C1	AC	AC	A	AB	AB	AB	AB	A	B	A	?	?	B2	C2F
20	あさつゆ	BC	C1	AC	AC	A	AB	B	B	AB	A	B	A	B	A	B2	C2F
21	あさぎり	BC	C1	B	BC	A	AB	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2	C2
22	山の息吹	BC	C1	BC	BC	A	B	B	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
23	ふうしゅん	BC	C1	BC	BC	A	B	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2	C2F
24	ほくめい	BC	C1	BC	BC	A	AB	AB	A	B	A	B	A	B	A	B2	C2
25	まきのはらわせ	BC	C1	BC	BC	A	AB	AB	B	A	A	B	A	B	A	EB2	C2F
26	べにふうき	BC	C1	BC	BC	A	AB	B	A	B	A	B	AB	AB	A	B2	C2
27	べにふじ	BC	C1	BC	BC	A	AB	B	AB	B	A	B	AB	B	A	B2	C2
28	みなみさやか	BC	C1	BC	BC	AB	AB	B	A	B	A	B	A	B	AB	EB2	C2F
29	めいりよく	BC	C1	BC	BC	AB	AB	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2E	C2
30	ふくみどり	BC	C1	C	BC	A	AB	AB	A	B	AC	B	A	B	A	B2E	C2
31	やまなみ	BC	C1	C	BC	A	AB	AB	AB	AB	AB	B	A	B	A	B2	C2
32	こまかげ	BC	C1	C	BC	A	AB	B	B	A	A	B	A	B	A	E	C2
33	ゆたかみどり	BC	C1	C	BC	A	B	B	AB	B	A	B	AB	B	A	B2	C2
34	ひめみどり	BC	C1	C	BC	A	B	B	B	A	A	B	A	B	A	B2	F
35	おくひかり	BC	C1	C	BC	AB	A	AB	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
36	そうふう	BC	C1	C	BC	AB	B	B	A	B	A	B	AB	AB	A	B2E	BC2
37	おくゆたか	BC	C1	C	C	A	B	B	B	AB	A	B	AB	B	A	B2	C2F
38	かなやみどり	BC	C1	C	C	AB	B	B	AB	AB	A	B	A	B	A	EB2	C2F
39	さわみずか	BCD	BC1	C	C	AB	A	AB	AB	AB	A	AB	A	B	A	EB2	C2F
40	藤かおり	BCD	BC1	C	C	AB	AB	B	A	B	A	B	AB	AB	A	B2E	BC2
41	おくみどり	BCD	BC1	C	BC	A	A	AB	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
42	あさのか	BCD	BC1	C	BC	A	AB	A	AB	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
43	むさしかおり	BCD	BC1	C	BC	AB	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
44	やまとみどり	BCD	BC1	BC	BC	A	AB	B	A	B	A	B	AB	B	A	B2G	C2G
45	やえほ	BCD	BC1	BC	BC	A	B	B	A	B	A	B	AB	B	A	B2	C2F
46	ま里し	BCD	BC1	BC	BC	A	B	B	AB	B	A	B	A	B	A	B2	C2
47	はるもえぎ	BCD	BC1	BC	BC	AB	B	B	A	B	A	B	A	B	A	EB2	C2F
48	さきみどり	BCD	BC1	BC	BC	AB	B	B	A	B	A	B	A	B	A	EB2	C2F
49	はつみじ	BCD	C1E	C	C	A	AB	B	AB	B	A	B	AB	B	A	B2	C2
50	ふじみどり	BCD	C1E	C	BC	A	AB	B	B	AB	A	AB	A	B	A	B2	C2F
51	さいのみどり	BD	B	C	C	AB	A	AB	A	B	A	B	AB	B	A	B2E	C2
52	みやまかおり	BD	BC1	C	BC	A	B	B	AB	AB	A	B	AB	B	A	B2E	C2
53	りょうふう	BD	BC1	C	BC	A	AB	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2	C2
54	きら香	BD	BC1	C	C	AB	AB	AB	A	B	A	B	A	B	A	E	C2
55	やぶきた	BD	BC1	C	C	AB	AB	AB	A	B	A	B	A	B	A	E	C2
56	香駿	BD	BC1	BC	BC	AB	AB	B	A	B	AB	B	A	B	A	E	C2
57	やまかい	BD	BC1	C	BC	AB	AB	B	AB	B	A	B	A	B	A	B2E	C2
58	べにひかり	BD	C1E	C	BC	A	AB	B	AB	B	A	AB	A	B	A	B2E	C2
59	おくむさし	C	C1	AB	AB	A	AB	B	A	B	A	B	A	B	A	B2	C2
60	たちほ	C	C1	AB	AB	A	B	B	AB	AB	A	B	A	B	A	B2E	C2
61	たまみどり	C	C1	AC	AC	A	A	AB	B	A	A	B	A	B	A	B2E	C2
62	ごこう	C	C1	C	C	A	AB	AB	AB	B	A	B	A	?	?	B2E	C2
63	しゅんめい	C	C1	C	C	A	B	B	AB	B	A	B	A	B	A	B2	C2F
64	静一印雑131	C	C1	C	BC	A	AB	B	AB	AB	A	B	B	A	A	B2	BC2
65	からべに	C	C1	C	BC	A	B	AB	AB	AB	A	B	AB	B	A	B2E	C2
66	くらさわ	D	B	BC	BC	A	A	AB	A	B	AB	B	AB	B	A	B2E	C2
67	おおいわせ	D	B	BC	BC	AB	B	B	A	B	A	B	A	B	A	EB2	C2F

図 22 開発した CAPS マーカーを用いた国産 67 品種の識別

左端の GS2B/*HinfI* から順に各マーカーのピークパターン毎にグループ分けをしていき、品種が同定可能となった位置を水色でマーキングした。ピークパターンが一致し、識別不能であった「はるもえぎ」と「さきみどり」、「きら香」と「やぶきた」を黄色でマーキングした。 Reprinted (adapted) with permission from Ujihara *et al. J. agric. Food Chem.* **59**:

1557-1564 (2011). Copyright (2011) American Chemical Society.

た 67 品種は、65 パターンのタイプに分類され、同一のパターンを示し相互識別が不可能な品種が 2 組あった。既存の CAPS マーカーではパターン的一致により識別不可能であった「はるみどり」と「とよか」については、新規に開発した CAPS マーカーにより識別可能となった。新規マーカーで識別不可能であった 2 組のうち、「はるもえぎ」と「さきみどり」については、既存の CAPS マーカーで識別可能であった。「やぶきた」と「きら香」については、「やぶきた」の枝変わり品種が「きら香」という関係であり、このような関係の品種では、ゲノムの限られた領域を比較する CAPS や SSR といった手法では相互識別は困難である。これらを識別するためには、果樹のブドウ (*Vitis vinifera* L.)、モモ (*Prunus persica* L.) の枝変わり品種の識別例のように^{91,92)}、amplified fragment length polymorphism (AFLP) や restriction landmark genomic scanning (RLGS) といったゲノムを広範囲に比較し違いを見出す手法を用いることが必要と考えられる。現在のところ、「きら香」は、新芽の色が白いという他の品種にはない特徴を有しており、新鮮葉の状態では「やぶきた」を含む他の品種と容易に識別が可能である。また新芽の色は製茶工程を経たリーフ茶にも反映され、「きら香」のリーフ茶は他品種のものが濃緑色であるのに比べ黄色であるため、識別が可能である。浸出液になった場合には、「やぶきた」との識別は不可能である。

以上より、ブレンド試料において原料品種を個別に同定可能な分析手法を確立するための基礎として、新規 CAPS マーカーの開発を試み、チャの品種識別に使用可能な 16 種を開発した。これらのマーカーにより、日本品種 65 種は同定が可能であった。断片パターンが一致する品種が 2 組、4 品種あったが、1 組については、既存の CAPS マーカーによる識別が可能であった。残る 1 組については、ゲノムの一部を比較する手法での識別は不可能な枝変わり品種とその元品種という関係であった。また、既存の CAPS マーカーを合わせ、チャの品種識別に使用可能なマーカーは全部で 23 となり、識別可能な日本品種は 66 品種（枝変わり品種とその元品種の 1 組はこの手法による識別は不可能であるため、同一の品種として扱った）とした。

実験方法

2-1 Simple sequence repeat (SSR) マーカーを用いた品種識別

実験材料

新鮮葉

主要日本品種 16 種（あさつゆ、べにふうき、かなやみどり、めいりよく、おおいわせ、おくひかり、おくみどり、さえみどり、さみどり、さやまかおり、さやまみどり、やぶきた、やまかい、やまなみ、やまとみどり、ゆたかみどり）の新鮮葉は、野菜茶業研究所金谷拠点の試験圃場より採取した。中国品種「鳩坑種」の新鮮葉は、静岡県農林技術研究所茶業研究センターの試験圃場より採取した。当日中に DNA 単離を行わない場合は、試料は -30°C の冷凍庫で保存した。

リーフ茶

日本品種のリーフ茶は野菜茶業研究所金谷拠点で製造された。中国品種「福雲」および「鳩坑種」のリーフ茶は、中国浙江省で栽培・製造されたものを三井農林株式会社より分与いただいた。市販のリーフ茶は小売店で購入した。

緑茶浸出液

第 1 章 1-2 節と同様に緑茶浸出液を調製した。

ブレンドモデル

中国浙江省産「鳩坑種」製リーフ茶を、野菜茶業研究所製「やぶきた」リーフ茶にブレンドした。ブレンド割合は、「鳩坑種」：「やぶきた」=100:0、50:50、30:70、10:90、5:95、0:100 の 6 通りとした。

DNA 単離

新鮮葉については、改変を加えた CTAB 法⁶⁶⁾により DNA を単離した。

リーフ茶については、茶葉 1 断片もしくは粉末化した茶葉より DNA を単離した。茶葉 1 断片を用いる場合には、第 1 章 1-1 節の方法により行った。粉末化した茶葉を用いる場合には、10～50 mg 程度の茶葉を 2×CTAB 抽出液 650 μ L に加え、新鮮葉の場合と同様に操作した。

緑茶浸出液については、第 1 章 1-2 節と同様に操作した。

SSR マーカの増幅と多型確認

チャゲノムより単離された SSR の増幅用プライマー対のうち、TMSLA10, 13, 17, 37, および 55 の 5 組に加え、ヤブツバキゲノムより単離された SSR の増幅用に設計され、チャゲノムについても増幅が可能であることが報告されている⁸⁴⁾プライマー対 1 組 (SSR-1) の、合計 6 組を供試した。SSR-1 については、既報のプライマーの他、公開されているフラグメントの塩基配列を参考に Rv プライマーを再設計して用いた。

SSR の増幅には、KOD DNA polymerase (東洋紡) を用いた。PCR 反応液組成、PCR プログラムについては、第 1 章 1-2 浸出液 (緑茶飲料) からの DNA 単離に詳述した。

多型解析には、ABI 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いた。操作の詳細は第 1 章 1-2 節と同様である。

2-2 新規 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカの開発

実験材料

マーカ開発には、14 種類のチャと 2 種類の近縁種を用いた。供試したチャ (あさつゆ、べにふうき、さやまかおり、静 7132、静・印雑 131、やぶきた、Z-1、金 Ck17、ME52、静在 16、鹿-Cp1、台湾山茶 95、Ak1699、枕 1 号) および近縁種のヤブツバキ、キンカチャの新鮮葉は、野菜茶業研究所金谷拠点および枕崎拠点の試験圃場より採取した。DNA 単離は、改変した CTAB 法⁶⁶⁾により行った。品種識別のためのタイピングには、マーカ開発

に供試した日本品種 7 品種（あさつゆ、べにふうき、さやまかおり、静 7132、静・印雑 131、やぶきた、Z-1）に日本品種 60 種を加え、合計 67 品種を用いた。

PCR によるフラグメント増幅と制限酵素処理、断片パターンの確認

CAPS マーカーの候補として、単離されたチャの ammonium transporter 2 種と glutamine synthetase 3 種の遺伝子、チャ幼根 EST からランダムに選抜された 26 種類のインサート配列を基に設計されたプライマー対を供試した。

PCR 反応液は、50～150 ng の DNA、プライマー各 0.25 μ M、dNTP mix 0.20 mM、MgCl₂ 2.0 mM、酵素に添付の反応バッファー、*ExTaq* DNA polymerase 0.025 U を含み、マーカー開発では滅菌水で容量を 25 μ L、品種のタイピングでは容量を 15 μ L とした。PCR プログラムは第 1 章 1-1 節と同様であるが、チャの遺伝子 5 種を対象としたプライマー対ではアニーリング温度 58°C、EST を対象としたプライマー対ではアニーリング温度 60°C とした。

マーカー開発では PCR 反応液 1.5 μ L を用いて 15 μ L の制限酵素反応液を調製した。品種のタイピングでは PCR 反応液 3 μ L を用いて 15 μ L の制限酵素反応液を調製した。いずれも酵素に付属のバッファーおよび試薬を使用し、容量の調整には滅菌水を用いた。各酵素の至適反応温度で 2 時間インキュベートした。

断片パターンの確認には、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度は 1.5～2%）を用いた。DNA の染色にはエチジウムブロミドを使用した。

DNA シーケンス

制限酵素処理に用いるのと同様に増幅した CAPS フラグメントを QIAGEN 社 QIAquick PCR Purification Kit で取扱説明に従って精製した。精製したフラグメントは pT7Blue T-vetcor (Novagen 社) に導入後、大腸菌 (*Escherichia coli*) コンピテントセル HB101

に導入した。形質転換処理後の大腸菌は 1 mL あたりアンピシリン 80 µg を添加した LB 寒天培地上に植菌し 37°C で一晩培養した。生じたコロニーのインサートサイズを colony-direct PCR で確認し、目的のフラグメントを有するものを選抜した。PCR 反応液の組成および PCR プログラムは CAPS フラグメントの増幅と同様である。目的のフラグメントが増幅された場合、QIAGEN 社 QIAquick PCR Purification Kit で取扱説明に従って精製し DNA シーケンスに用いた。DNA シーケンスは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ）を用いて行った。

第 3 章 葉緑体ゲノムを用いた緑茶の 原産地判別

日本国内の緑茶総消費量のうち、約 6.7%分は外国からの輸入である³³⁾。輸入元としては、中国が大部分を占め、全体の約 90%であり、以下ケニア (2.7%)、オーストラリア (2.6%)、ベトナム (1.2%) と続く³³⁾。ケニア、オーストラリアのチャ栽培については、比較的近年人為的に導入されたものである。中国南部、ベトナム北部はもともとのチャの自生地であろうと推測されており⁹³⁾、中国では現在の主要な産地にチャ栽培が広がったのは 7~9 世紀ごろ⁹⁴⁾であるとされている。日本のチャについては諸説あり、歴史的記録にある中国よりの導入前から自生していたという説⁹⁵⁾もあるが、自生するとされるチャ（ヤマチャと呼ばれる）が茶園などから遠く離れては見出されないこと⁹⁶⁾などから、自生チャは存在せず、渡来したものであるとする説が有力である。Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 遺伝子をプローブに用いた RFLP 解析により、日本のチャは限られた集団を起源とすることが示唆されている^{86,97,98)}。

外国産緑茶については、原料品種が明確でないことが多く、また、信頼のできる品種標品を入手することは困難である。品種標品が入手可能な場合は、第 2 章のように、SSR や CAPS などの DNA マーカーによりあらかじめタイピングをすることで同定が可能であるが、原産国表示に関しては、品種を個別に同定する必要はないが、日本産チャと外国産チャを識別可能な何らかの方法の開発が必要である。

葉緑体ゲノムは植物種間で比較的構造の保存性が高く、単一の環状構造をしている。また、一般の植物では母系遺伝することが知られており、系統学や系統地理学に多用される^{99,100,101)}。チャについても、葉緑体ゲノムを利用しての日本産と外国産の識別、また外国産チャ同士の産地の識別が可能なのではと考え、日本在来チャから育成された日本品種と、中国およびベトナム産チャの葉緑体ゲノムの比較を行った。ゲノムの比較には、ゲノム上の Rubisco large subunit 遺伝子(*rbcL*)の 3'末端側 110 bp、acetyl-CoA carboxylase の carboxyltransferase ドメインの β -subunit 遺伝子 (*accD*) の 5'末端側 1027 bp、および両遺伝子間の intergenic region 526 bp の、合計 1663 bp の塩基配列 (*rbcL-accD* 領域) を用

いた。この領域は、タデ科 (Polygonaceae) のイタドリ (*Polygonum cuspidatum* Siebold et Zucc.)、シヤクチリソバ (*Fagopyrum cymosum* Meisn.) では種内での地理系統学的解析に有用であることが報告されている^{102,103)}。そこで、チャについてもこの領域を利用することとした。

結果と考察

供試したチャは、日本在来チャから選抜育成された日本品種 18 種と、外国より導入された個体を種子親とする日本の 3 品種、中国品種「福雲」製緑茶、品種名の明らかなウーロン茶 6 種類 (八仙、黄旦、黄金桂、鳳凰単欒、武夷肉桂、毛蟹)、中国品種「鳩坑種」の新鮮葉 4 個体分、雲南省および広東省産栽培チャ 22 個体分の葉、ベトナム産栽培チャ 7 個体分の葉の合計 68 サンプルである。

各サンプルの塩基配列を比較した結果、12 個の SNP、1 カ所の poly(T) の SSR、2 個の挿入／欠損変異が見出され、これを基に、供試したチャは 15 種類のタイプに分類された。検出された多型部位を表 15 に示した。表中の多型部位の塩基番号は、「やぶきた」の *rbcL-accD* 領域を基準とした。日本品種のうち在来チャより育成された品種では、この領域の多型性は低く、配列内の 2 カ所に生じた SNP によって、2 つのタイプ (Ia および II) のみに分類された。日本品種のうちインドのアッサム地方より導入された遺伝資源を種子親とする 2 つの紅茶用品種「はつもみじ」と「べにほまれ」も、これら 2 つのタイプに分類された。日本品種の 1 つ「からべに」のみは、別のタイプに分類されたが、この品種は中国湖北省から導入された遺伝資源を種子親としている。

表 15 チャ葉緑体 *rbcL-accD* 領域の塩基配列で見出された多型とそれに基づく分類

タイプ	多型部位																Accession No	検出された試料 の産地
	280 ^a	349	495	503	528	645	692	703	764	954	1038	1107	1218	1328	1375			
I a	C	C	C	T	(T) ₁₁	T	G	G	G	G	A	G	in	del	G	AB207869	日本、中国、 ベトナム	
b	- ^b	-	-	-	(T) ₁₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AB231630	ベトナム	
II	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	-	AB231628	日本、中国	
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	AB231629	中国由来の日本品 種のみ	
IV a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	AB231631	ベトナム	
b	-	-	-	-	(T) ₁₃	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	AB231632	中国、ベトナム	
c	-	-	-	-	(T) ₁₄	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	AB231633	中国	
V a	-	-	-	-	(T) ₁₃	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	AB231634	中国	
b	-	-	-	-	(T) ₁₄	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	AB231635	中国	
VI a	-	-	-	-	(T) ₁₂	-	-	A	-	A	-	A	del	-	T	AB231636	中国	
b	-	-	-	-	(T) ₁₃	-	-	A	-	A	-	A	del	-	T	AB231637	中国	
c	-	-	-	-	(T) ₁₅	-	-	A	-	A	-	A	del	-	T	AB231638	中国	
VII	T	T	T	-	(T) ₁₇	-	-	A	-	A	-	-	del	in	T	AB231639	中国	
VIII	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AB306664	中国	

^a 「やぶきた」の *rbcL-accD* 領域 (AB207869) における塩基番号。

^b 「やぶきた」の配列に一致することを示す。

Ujihara *et al. Tea Res. J.* **104**: 15-23 (2007)より許可を受けて転載。

©2007 日本茶業技術協会

日本のチャ育種の初期には、在来チャからの選抜により品種が育成されていたが、その後交配育種への転換が進み、近年では新規に育成される品種の大部分は既存の品種を基に作出されている。本実験に用いた品種は表 16 にある 21 種類だが、それらを母系の祖先とする品種が 40 品種育成されている。葉緑体ゲノムの特性により、これらの品種も母系祖先

表 16 供試した日本品種とそれらを母系祖先とする品種

タイプ	供試した品種			供試した品種の母系子孫		
Ia	あさぎり	あさひ	ごこう	あさのか	ふくみどり	香駿
	はつもみじ	こまかげ	きょうみどり	くらさわ	はるもえぎ	めいりよく
	さみどり	やぶきた		みえ緑萌 1 号	みなみかおり	みねかおり
				みねゆたか	むさしかおり	おくひかり
				おくみどり	さえみどり	さいのみどり
				さきみどり	さわみずか	さやまかおり
				静 7132	するがわせ	そうふう
				つゆひかり	やまかい	山の息吹
				ゆめかおり	ゆめわかば	
II	あさつゆ	べにほまれ	ひめみどり	べにふじ	べにふうき	はるみどり
	かなやみどり	くりたわせ	まきのはらわ	ほくめい	いずみ	摩利子
	なつみどり	さやまみどり	せ	みなみさやか	おおいわせ	おくむさし
	うじひかり	やえほ	たかちほ	おくゆたか	松寿	しゅんめい
			やまとみどり	とよか	ゆたかみどり	
III	からべに					

である在来チャ由来品種と同じタイプであることから、本研究により、日本在来チャを母系祖先に持つ日本品種 61 種の葉緑体ゲノムは、2 カ所の SNP により識別される 2 タイプのみを示すことが明らかになった。Kato^h らは、葉緑体 ribosomal RNA maturase (*matK*) 遺伝子 1230 bp の塩基配列を比較して日本を含むアジア地域の栽培チャの分類を行っており、商業品種を含む日本の栽培チャが 1 カ所の SNP により識別される 2 つのタイプのみに分類されると報告している¹⁰⁴⁾。Kato^h らの報告では、品種名について記載がないが、本研究の 2 つのタイプとグループ分けが一致するのではないかと推測される。また田中、太田 (1999) は、母性遺伝する RAPD マーカーを用いて、日本在来チャより選抜育成された品種の大部分が「やぶきた」型と「あさつゆ」型の 2 タイプのみに分類されると報告しているが¹⁰⁵⁾、供試サンプル名より、本研究の Ia タイプおよび II タイプにそれぞれ相当すると推測される。

一方、中国産およびベトナム産チャでは、日本産チャで見出された 2 タイプを含め、多様なタイプが見出された。中国産チャでは、Ia および II タイプの他、Ic, IVa, IVb, IVc, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VII, VIII の 11 タイプが、ベトナム産チャでは II タイプは検出されなかったが、Ia は検出され、その他 IVa および IVb の 2 タイプが検出された。図 23 に、各サンプルの産地とタイプをまとめた。

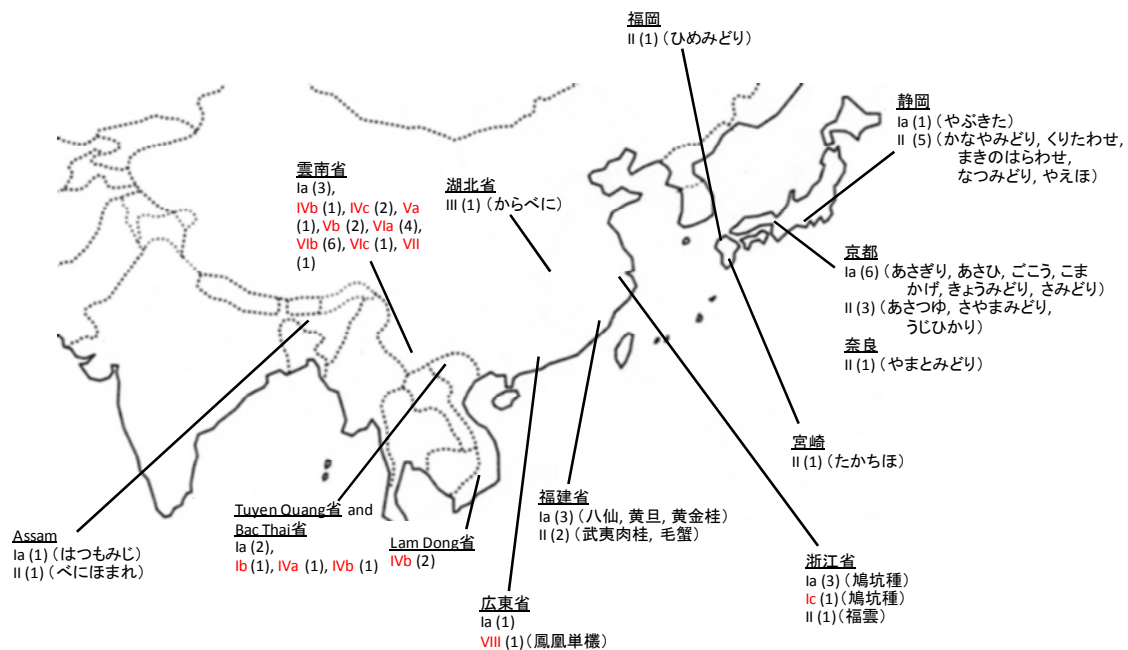


図 23 各チャ試料の産地と葉緑体遺伝子のタイプ

カッコ内はそのタイプを示した試料数。品種については名前を示した。日本産チャでは検出されなかったタイプを赤字で示した。

Ujihara et al. *Tea Res. J.* **104**: 15-23 (2007)より許可を受けて転載。

©2007 日本茶業技術協会

中国南部では、チャと、近縁種である *C. taliensis* (W. W. Smith) Melchoir および *C. irrawadiensis* P. K. Barua の分布が重なっている。*C. taliensis* および *C. irrawadiensis* の *rbcL-accD* 領域の塩基配列をチャのものと比較すると、表 17 にあるように 5 つの SNP と poly(T) のリピート数、3 カ所の挿入／欠損変異が見出された。このうち 703 位と 954 位の SNP、1218 位と 1328 位の挿入／欠損変異については、中国雲南省産の栽培チャの一部が

表 17 チャ、*C. taliensis*、*C. irrawadiensis* の *rbcL-accD* 領域の塩基配列で見出された多型

試料	多型部位									Accession No.
	528 ^a	703	831	954	1038	1218	1236	1328	1422	
<i>C. sinensis</i>	(T) ₁₁	G	A	G	A	in	sin	del	G	AB207869
<i>C. irrawadiensis</i>	– ^b	A	–	A	C	del	ta/ir	in	T	AB207874
<i>C. taliensis</i>	(T) ₁₂	A	C	A	C	del	ta/ir	in	T	AB207881

^a 「やぶきた」の *rbcL-accD* 領域 (AB207869) における塩基番号。

^b 「やぶきた」の配列に一致することを示す。

Ujihara *et al.* *Tea Res. J.* **104**: 15-23 (2007)より許可を受けて転載。

©2007 日本茶業技術協会

有する塩基配列と一致した (表 13 のタイプ VIa, VIb, VIc, および VII)。これは、Katoh らの、中国やベトナム等の地域で採取されたチャでは、一部が *C. taliensis* および *C. irrawadiensis* と共通する配列を有する個体があるという報告に一致する¹⁰⁴⁾。また、ミャンマーにチャと *C. irrawadiensis* との種間雑種が存在すること、*C. irrawadiensis* 系統の品種が存在することも報告されている^{106,107,108)}ことから、本実験に用いた雲南省産栽培チャについても、同様に *C. taliensis* もしくは *C. irrawadiensis* との種間雑種、またはその後代ではないかと推測される。この挿入／欠損変異について、他の *Camellia* 属植物 11 種 (*C. assimilis*, *C. salicifolia*, *C. pitardii*, *C. cuspidata*, *C. saluenensis*, *C. kissi*, *C. furfracea*, *C. hongkongensis*, *C. tsaii*, *C. japonica* および *C. sasanqua*) は、チャと同じタイプであり、*C. taliensis* と *C. irrawadiensis* のみが供試した他の *Camellia* 属植物とは異なるタイプを示した (表 18)。

表 18 *Camellia* 属内での *rbcL-accD* 領域 703 位、954 位、1218 位、1328 位の塩基配列の比較

節	種	多型部位				Accession No
		703 ^a	954	1218	1328	
<i>Thea</i>	<i>C.sinensis</i>	G	G	in	del	AB207869
	<i>C. taliensis</i>	A	A	del	in	AB207881
	<i>C. irrawadiensis</i>	A	A	del	in	AB207874
<i>Camelliopsis</i>	<i>C. assimilis</i>	– ^b	–	–	–	AB207870
	<i>C. salicifolia</i>	–	–	–	–	AB207878
<i>Theopsis</i>	<i>C.cuspidata</i>	–	–	–	–	AB207871
	<i>C. tsaii</i>	–	–	–	–	AB207882
<i>Camellia</i>	<i>C. hongkongensis</i>	–	–	–	–	AB207873
	<i>C. japonica</i>	–	–	–	–	AB207875
	<i>C. pitardii</i>	–	–	–	–	AB207877
	<i>C. sluenensis</i>	–	–	–	–	AB207879
<i>Paracamellia</i>	<i>C. kissi</i>	–	–	–	–	AB207876
	<i>C. sasanqua</i>	–	–	–	–	AB207880
<i>Heterogenea</i>	<i>C. furfracea</i>	–	–	–	–	AB207872

^a 「やぶきた」の *rbcL-accD* 領域 (AB207869) における塩基番号。

^b 「やぶきた」の配列に一致することを示す。

前述のように、日本在来チャを母系の祖先とする日本品種では、葉緑体ゲノムは多様性が低く、2つのタイプのみが検出された。これらの品種で国内のチャの総栽培面積 47882 ha 中 44300 ha (93%) を占めている¹³⁾。供試した品種の内、中国産チャを種子親として育成された「からべに」は、他の日本品種とは異なるタイプであったが、この品種は、国内でも栽培面積が限られており、0.3 ha (総栽培面積の 0.0006%) が栽培されているに過ぎない¹³⁾。また緑茶にも使用可能ではあるが、基本的には紅茶用品種であることから、国産の緑茶に「からべに」が使用されることは稀であろう。従って、現在一般的に栽培される品種を原料とした市販の日本産緑茶の葉緑体ゲノムのタイプを確認した場合に検出されるのは、国産品種が示す 2 タイプのみであると予測される。本実験において、中国およびベトナム産栽培チャでは、国産品種が示すタイプ以外に、日本産品種が保有しない特異的なタイプ

12 種が検出されたことから、外国在来チャおよびそれらより育成された品種を使用した輸入緑茶については、葉緑体ゲノムを比較することで日本産緑茶との識別が可能であると考えられる。

実験方法

実験材料

日本産チャ 21 サンプルは、日本在来チャより選抜された品種 18 種類および中国、インドより導入された遺伝資源を母系の祖先とする 3 品種を用いた。中国産チャ 33 サンプルは、8 品種 11 個体のリーフ茶および新鮮葉に加え、雲南省および広東省で採取された栽培チャの葉 22 個体分を用いた。リーフ茶のうち 6 品種（八仙、黄旦、黄金桂、鳳凰単叢、武夷肉桂、毛蟹、いずれもウーロン茶）は、元野菜茶業研究所 武田善行博士より分与いただいた。

「福雲」のリーフ緑茶は三井農林株式会社より分与いただいた。「鳩坑種」新鮮葉 4 個体分は、静岡県農林技術研究所茶業研究センターの試験圃場より採取した。ベトナム産チャ 7 サンプルは、Lam Dong 省, Tuyen Quang 省および Bac Thai 省で採取された栽培チャの葉を用いた。近縁種の *C. taliensis*, *C. irrawadiensis*, *C. assimilis*, *C. salicifolia*, *C. cuspidata*, *C. tsaii*, *C. hongkongensis*, *C. pitardii*, *C. saluenensis*, *C. kissi*, および *C. furfracea* の新鮮葉は野菜茶業研究所枕崎拠点で採取した。*C. japonica* および *C. sasanqua* の新鮮葉は野菜茶業研究所金谷拠点で採取した。

DNA 単離

各サンプルからの DNA 単離は、改変を加えた CTAB 法⁶⁶⁾により行った。

葉緑体 *rbcL-accD* 領域を含むフラグメントの増幅とシーケンス解析

rbcL-accD フラグメント増幅用プライマーは、*rbcL* および *accD* 遺伝子の配列内部に設計した。*rbcL* 遺伝子は公開されているチャの塩基配列（accession number: AF380037）を利用し、増幅用プライマー *rbcLFw1* を設計した。*accD* 遺伝子については、クワ科植物での *accD* 遺伝子増幅用に設計されたプライマー対（D1 および D2）¹⁰⁹⁾を使用してチャ葉緑体ゲ

ノム上の *accD* 遺伝子から約 200 bp のフラグメントを増幅し、塩基配列を決定後、その配列を基にチャ *accD* 増幅用プライマー accDRv1 を設計した。フラグメント増幅には日本品種「やぶきた」を用いた。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

rbcL-accD フラグメント増幅用プライマー対 ¹⁰⁹⁾

*rbcL*Fw1 : 5'-CATAACCCCAATTGCTACGG-3'

*accD*Rv1 : 5'-GAAGGACGTGATCTTGCTCGT-3'

各サンプルからの *rbcL-accD* フラグメントの増幅には *ExTaq* DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた。PCR 反応液は、100 ng の DNA、各プライマーを 0.25 μ M、dNTP 200 μ M、MgCl₂ 2 mM、0.625 U の *ExTaq* DNA polymerase を含有し、滅菌水で容量を 25 μ L とした。PCR プログラムは、第 1 章 1-1 での CAPS マーカーの増幅と同様である。アニーリング温度は 60°C で行った。PCR 反応液を QIAGEN 社 QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、増幅されたフラグメントの塩基配列を BigDye Terminator v3.0 もしくは v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて決定した。得られた塩基配列は ClustalW を用いて相互比較を行った ¹¹⁰⁾。

第 4 章 総括

第 1 章

DNA 品種識別を行うためには、分析対象の試料より DNA を単離する方法が必要となる。現在、緑茶の品種識別に利用可能な DNA マーカーは共優性マーカーであり、様々な遺伝子型が混在するブレンド試料の原料品種を同定するためには、リーフ茶の場合は各茶葉を個別に分析する必要があるが、これまで茶葉 1 断片からの DNA 単離法についての報告はなかった。また、近年緑茶の消費形態として大きな割合を占める PET 等ボトル詰め飲料についても、DNA 単離法が確立されていなかった。そのため本研究では、茶葉 1 断片からの DNA 単離法および市販飲料等緑茶浸出液からの DNA 単離法を確立するために検討を行い、これらの試料からの DNA 単離を可能とした。

第 2 章

検出能力の高い SSR マーカーを用いて、国内の栽培面積の 91%を占める主要な茶品種 16 種の識別が可能であることを示し、リーフ茶についてもこのマーカーによって品種識別が可能であることを確認した。日本品種のみならず、品種標品の入手可能な外国産品種についても、識別が可能であった。外国産品種では、日本品種から容易に識別可能な allele を保有していることがあり、この allele を特異的識別マーカーとしてブレンド試料に使用された外国産品種を検出可能であることを示した。飲料等の緑茶浸出液では、非特異的増幅によりピークパターンの正確な判別が不可能な場合があり、品種識別に SSR を用いるのは不適當であることを明らかにした。

より検出能力が高く、ブレンド試料の原料品種識別の有力な手段であると期待できる SNP マーカー構築のための基礎として、CAPS マーカーの開発を行った。新たに 16 種の CAPS マーカーを開発し、日本品種 67 品種が 66 種類のタイプ（枝変わり品種とその元品種は同一のタイプに分類される）に分類可能であることを示した。

第 3 章

原料品種が不明な場合においても外国産緑茶と日本産緑茶との識別を可能とするため、日本産チャと外国産チャの葉緑体ゲノムの比較を行った。比較に用いた 1663 bp の領域では、日本在来チャより育成された日本品種は 2 つの SNP により分類される 2 タイプのみを示した。供試した品種およびそれらを母系祖先とする品種で、日本国内のチャの総栽培面積の 93%を占めている。一方、供試した外国産（中国およびベトナム）栽培チャでは、12 ヶ所の SNP、1 つの SSR、2 カ所の挿入／欠損変異が見出され、日本産チャが示す 2 タイプ以外に、外国産チャ特異的な 12 タイプが見出された。

引用文献

- 1) FAOSTAT, FAO Statistics Division 2012, 04 April 2012.
<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- 2) Chatuvedula, V. S. P., Prakash, I. (2011) The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *J. Med. Plant. Res.*, **5**(11), 2110–2124.
- 3) 安田 環 (1994)、製茶概説、茶の栽培と利用加工、養賢堂、東京、pp. 45–60.
- 4) 日本茶業中央会 (2012a)、平成 24 年版茶関係資料、p. 58.
- 5) Banerjee, B. (1992) Botanical classification of tea, in Tea Cultivation to consumption, edited by Willson, K. C., Chapman & Hall, London, UK, pp. 25–51.
- 6) Wachira, F. N., Kamunya, S., Kaori, S., Chalo, R., and Maritim, T. (2013) The tea plants: Botanical aspects, in Tea in health and disease prevention, edited by Preedy, V. R., Elsevier, London, UK, pp. 3–18.
- 7) Takeo, T. (1992) Green and semi-fermented teas, in Tea Cultivation to consumption, edited by Willson, K. C., Chapman & Hall, London, UK, pp. 413–457.
- 8) Ahmed, S. and Stepp, J. R. (2013) Green tea: The plants, processing, manufacturing and production, in Tea in health and disease prevention, edited by Preedy, V. R., Elsevier, London, UK, pp. 19–31.
- 9) 武田善行 (2007)、チャの育種 100 年の回顧と今後の方向、*茶業研究報告*、**103**, 1–40.
- 10) 根角厚司 (2008)、チャの育種の歴史と動向、茶大百科 I、農山漁村文化協会、東京、

pp. 533–536.

- 11) 農林水産省品種登録ホームページ <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
- 12) 日本茶業中央会 (2012)、平成 24 年版茶関係資料、pp. 118–123.
- 13) 日本茶業中央会 (2012)、平成 24 年版茶関係資料、pp. 23–25.
- 14) 山口優一 (2008)、普通煎茶の製茶法、茶大百科 I、農山漁村文化協会、東京、pp. 684–692.
- 15) 増澤武雄 (2008)、煎茶の仕上げ加工、茶大百科 I、農山漁村文化協会、東京、pp. 811–821.
- 16) Schmidt, H., Roßmann, A., Voerkelius, S., Schnitzler W. H., Georgi M., Graßmann J., Zimmermann, G., and Winkler, R. (2005) Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production. *Isot. Environ. Health Stud.*, **41**(3), 223–228.
- 17) Primrose, S., Woolfe, M., and Rollinson, S. (2010) Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends Food Sci. Tech.*, **21**(12), 582–590.
- 18) Luykx, D. M. A. M. and van Ruth, S. M. (2008) An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chem.*, **107**(2), 897–911.
- 19) Kelly, S., Heaton, K., and Hoogewerff, J. (2005) Tracing the geographical origin of food: The application of multi-isotope analysis. *Trends Food Sci. Tech.*, **16**(12), 555–567.

- 20) Cambrai, A., Marcic, C., Morville, S., Houer, P. S., Bindler, F., and Marchioni, E. (2010) Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **58**(3), 1478–1483.
- 21) Woolfe, M. and Primrose, S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.*, **22**(5), 222–226.
- 22) Miraglia, M., Berdal, K. G., Brera, C., Corbisier, A., Holst-Jensen, A., Kok, E. J., Marvin, H. J. P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J. P. P. F. and Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem. Toxicol.*, **42**(7), 1157–1180.
- 23) Fernández-Cáceres, P. L., Martín, M. J., Pablos, F., and Gustavo González, A. (2001) Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *J. Agric. Food Chem.* **49**(10), 4775–4779.
- 24) Hayashi, N., Ujihara, T., Tanaka, E., Kishi, Y., Ogawa, H., and Matsuo, H. (2011) Annual variation of natural ¹⁵N abundance in tea leaves and its practicality as an organic tea indicator. *J. Agric. Food Chem.*, **59**(18), 10317–10321.
- 25) 農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律

<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S25/S25HO175.html>
- 26) Higdon, J. V. and Frei, B. (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **43**(1), 89–143.
- 27) Crespy, V. and Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J. Nutr.*, **134**(12), 3431S–3440S.
- 28) Harada, U., Chikama, A., Saito, S., Takase, H., Nagano, T., Hase, T. and

- Tokimitsu, I. (2005). Effects of the long-term ingestion of tea catechins on energy expenditure and dietary fat oxidation in healthy subjects. *J. Health Sci.*, **51**(2), 248–252.
- 29) 山本（前田）万里、佐野満昭、松田奈帆美、宮瀬敏男、川本恵子、鈴木直子、吉村昌恭、立花宏文、袴田勝弘（2001）、茶の品種、摘採期と製造法によるエピガロカテキン 3-*O*-(3-*O*-メチル)ガレート含量の変動、*日本食品科学工学会誌*、**48** (1), 64–68.
- 30) 近藤貞昭、池田奈実子、根角厚司、田中淳一、武田善行、武弓利雄、山口 聡（2003）、緑茶及び半発酵茶用新品種‘そうふう’の育成、*野菜茶業研究所報告*、**2**, 71–82.
- 31) Sawai, Y., Yamaguchi, Y., and Tanaka, J. (2004) Methyl anthranilate is the cause of cultivar-specific aroma in the Japanese tea cultivar ‘Sofu’. *JARQ*, **38**(4), 271–274.
- 32) 内野博司、本多勇介、中島健太、佐々木功二、小林 明、田中江里、久米信夫、酒井 崇、嶋崎 豊、石川巖、岡野信雄、京極英雄、船越昭治、北田嘉一、淵ノ上康元、田中萬吉（2009）、軽い萎凋により香気と滋味が高くなる茶新品種‘ゆめわかば’の育成、*茶業研究報告*、**107**, 19–30.
- 33) 財務省貿易統計、http://www.customs.go.jp/toukei/info/index_e.htm
- 34) 日本茶業中央会（2012）、平成 24 年版茶関係資料、p. 58.
- 35) 池田奈実子、堀江秀樹、向井俊博、後藤哲久（1993）、各茶種用チャ品種の一番茶及び秋芽の個別アミノ酸含量の特徴、*茶業研究報告*、**78**, 67–75.
- 36) 池田奈実子、堀江秀樹、向井俊博、後藤哲久（1993）、一番茶及び秋芽の化学成分含量の品種間差異、*茶業研究報告*、**77**, 13–21.

- 37) 阿南豊正、中川致之 (1974)、茶葉の化学成分含量に及ぼす光の影響、*日本農芸化学会誌*、**48**(2), 91–96.
- 38) Tanksley, S. D. (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**(1), 3–8.
- 39) Lee, M. (1995) DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.*, **55**, 265–344.
- 40) Paul, S., Wachira, FN., Powell, W., and Waugh, R. (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **94**(2), 255–263.
- 41) Mondal, T. K., Bhattacharya, A., Laxmikumaran, M., and Ahuja, P. S. (2004) Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **76**(3), 195–254.
- 42) 田中淳一 (2005)、チャのクワシロカイガラムシ抵抗性 DNA マーカー選抜と将来展望、*農林水産技術研究ジャーナル*、**28**(9), 39–44.
- 43) Tanaka, J. (1996) RAPD linkage map of tea plant and the possibility of application in the tea genetics and breeding. *Tea Res. J.*, **84**, 44–45.
- 44) Hackett, C. A., Wachira, F. N., Paul, S., and Powell, W. (2000) Construction of genetic linkage map for *Camellia sinensis* (tea). *Heredity*, **85**(4), 346–355.
- 45) Chen, L., Zhou Z. X., and Yang, Y. J. (2007) Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. *Euphytica*, **154**(1–2), 239–248.

- 46) Taniguchi, F., Furukawa, K., Ota-Metoku, S., Yamaguchi, N., Ujihara, T., Kono, I., Fukuoka, H., and Tanaka, J. (2012) Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*). *Breed. Sci.* **62**(3), 263–273.
- 47) Ahmed, F. E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.*, **20**(5), 215–223.
- 48) Teletchea, F., Maudet, C., and Hänni, C. (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.*, **23**(7), 359–366.
- 49) Dalmaso, A., Civera, T., La Neve, F., and Bottero, M. T. (2011) Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. *Food Chem.*, **124**(1), 362–366.
- 50) Kaundun, S. S. and Matsumoto, S. (2003) Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *Theor. Appl. Genet.*, **106**(3), 375–383.
- 51) Kaundun, S. S.; Matsumoto, S. (2004) PCR-based amplicon length polymorphisms (ALPs) at microsatellite loci and indels from non-coding DNA regions of cloned genes as a means of authenticating commercial Japanese green teas. *J. Sci. Food Agric.*, **84**(8), 895–902.
- 52) Bandana, M. S. and Ahuja P. S. (1999) Isolation and PCR amplification of genomic DNA from market samples of dry tea. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **17**(2), 171–178.
- 53) Kaundun, S. S. and Matsumoto, S. (2003) Identification of processed Japanese

- green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(7), 1765–1770.
- 54) Lockley, A. K. and Bardsley, R. G. (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci. Tech.*, **11**(2), 67–77.
 - 55) Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., and Fogher, C. (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chem.*, **83**(1), 127–134.
 - 56) Pafundo, S., Agrimonti, C., and Marmiroli, N. (2005) Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.*, **53**(18), 6995–7002.
 - 57) Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E., and Marmiroli, N. (2007) Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(15), 6052–6059.
 - 58) Hellebrand, M., Nagy, M. and Mörsel, J-T. (1998) Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **206**(4), 237–242.
 - 59) Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N. and Ohtsubo, K. (2007) Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(25), 10388–10395.
 - 60) Ohtsubo, K. and Nakamura, S. (2007) Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(4), 1501–1509.

- 61) Ohtsubo, K., Suzuki, K., Haraguchi, K. and Nakamura, S. (2008) Novel method for preparation of the template DNA and selection of primers to differentiate the material rice cultivars of rice wine by PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**(6), 1020–1028.
- 62) 村上恭子、河田和利 (2008) 市販キットを用いた小麦加工食品からの簡便迅速な DNA 抽出法、*香川県農業試験場研究報告*、**59**, 45–49.
- 63) 紙谷元一 (2007) 小豆及び小豆餡の DNA 識別、*豆類時報*、**49**, 29–34.
- 64) 中川 藍、田原 誠、山下裕樹、大山由美 (2010) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いたアズキ加工食品の簡易品種同定法の検討、*DNA 多型*、**18**, 209–214.
- 65) 寺上伸吾、保坂ふみ子、西尾聡悟、澤村 豊、高田教臣、上田恵理子、西谷千佳子、今井 剛、齋藤寿広、山本俊哉 (2009) クリ加工品からの DNA 鑑定技術の開発、*DNA 多型*、**17**, 92–95.
- 66) Kaundun, S. S. and Park, Y. G. (2002) Genetic structure of six Korean tea plantations as revealed by RAPD-PCR markers. *Crop Sci.*, **42**(2), 594–601.
- 67) 最新・ソフトドリンク編集委員会 (2003)、緑茶飲料の製造法、最新・ソフトドリンク、光琳、東京、pp. 487–495.
- 68) 茶のいれかた研究会 (1973)、茶のいれかたの検討、*茶業研究報告*、**40**, 58–66.
- 69) 原 利男、久保田悦郎、堀田 博、服部孝雄、野田忠行 (1986)、緑茶缶ドリンクの製造法、*茶業研究報告*、**64**, 35–38.
- 70) Liang, Y., Lu, J., and Zhang, L. (2002) Comparative study of cream in infusions of

- black tea and green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **37**(6), 627–634.
- 71) Singh, R. P., Singh, M., King, R. R. (1998) Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. *J. Virol. Methods*, **74**(2), 231–235.
 - 72) Koonjul, P. K., Brandt, W. F., Farrant, J. M., Lindsey, G. G. (1999) Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **27**(3), 915–916.
 - 73) John, M. E. (1992) An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenols. *Nucleic Acids Res.*, **20**(9), 2381.
 - 74) Jobes D. V. Hurley, D. L., and Thien, L. B. (1995) Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. *Taxon*, **44**(3), 379–386.
 - 75) Ujihara, T., Matsumoto, S., Hayashi, N., and Kohata, K. (2005) Cultivar identification and analysis of the blended ratio of green tea production on the market using DNA markers. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**(1), 43–45.
 - 76) 田中淳一、太田（目徳）さくら、武田善行 (2004)、ツバキ園芸品種‘炉開き’が種子親ヤブツバキ (*Camellia japonica*) ×花粉親チャ (*C. sinensis*) の種間交雑種であることの RAPD および SSR マーカーによる確認とチャ育種への利用の可能性、*育種学研究*、**5**(4), 149–154.
 - 77) Gupta, P. K., Balyan, H. S., Sharma, P. C., and Ramesh, B. (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr. Sci.*, **70**(1), 45–54.

- 78) Lopes M. S., Sefc, K. M., Eiras Dias, E., Steinlellner, H., Lamier da Câmara Machado, M., and da Câmara Machado, A. (1999) The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Teor. Appl. Genet.*, **99**(3–4), 733–739.
- 79) Wunsch, A. and Hormaza, J. I. (2002) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, **125**(1), 59–67.
- 80) Varshney, R. K., Graner, A., and Sorrells, M. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.*, **23**(1), 48–55.
- 81) Caser, M., Marinoni, D. T., and Scariot, V. (2010) Microsatellite-based genetic relationships in the genus *Camellia*: potential for improving cultivars. *Genome*, **53**(5), 384–399.
- 82) Sharma, R. K., Bhardwaj, P., Negi, R., Mohapatra, T., and Ahuja, P. S. (2009) Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.). *BMC Plant Biol.*, **9**:53. DOI: 10.1186/1471-2229-53.
- 83) Ueno, S., Tomaru, N., Yoshimaru, H., Manabe, T., and Yamamoto, S. (2000) Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth forest, Tsushima, Japan. *Mol. Ecol.*, **9**(6), 647–656.
- 84) Kaundun, S. S. and Matsumoto, S. (2002) Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome*, **45**(6), 1041–1048.

- 85) 独立行政法人 種苗管理センター (2008)、DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン-SSR を中心として-。
- 86) Matsumoto, S., Kiriiwa, Y., and Takeda, Y. (2002) Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. *Theor. Appl. Genet.*, **104**(6-7), 998-1002.
- 87) 中国茶品種編纂委員会 (2001)、中国茶樹品種誌、上海科学技術出版社、上海、中国、p. 30.
- 88) Syvanen, A. C. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 930-942.
- 89) Rudi, K. and Holck, A. L. (2003) Real-time closed tube single nucleotide polymorphism (SNP) quantification in pooled samples by quencher extension (QEST). *Nucleic Acids Res.*, **31**(19), e117. DOI: 10.1093/nar/gng118
- 90) Qiu, P., Soder, G. J., Sanfiorenzo, V. J., Wang, L., Greene, J. R., Fritz, M., Cai, X-Y. (2003) Quantification of single nucleotide polymorphisms by automated DNA sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**(2), 331-338.
- 91) Scott, K. D., Albert, E. M., Lee, L. S., and Henry, R. J. (2000). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica*, **113**(3), 245-249.
- 92) Mase, N., Iketani, H., Sato, Y. (2007) Analysis of bud sport cultivars of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) by simple sequence repeats (SSR) and restriction landmark genomic scanning (RLGS). *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **76**(1), 20-27.

- 93) 橋本 実 (2008)、チャの起源と分布、茶大百科 I、農山漁村文化協会、東京、pp. 3–5.
- 94) Ukers, W. H. (1935) Tea in the beginning, in All about tea, The tea and coffee trade journal company, NY, USA, pp. 1–10.
- 95) 大石貞男 (2004)、日本茶業発達史、大石貞男著作集 I、農山漁村文化協会、東京、pp. 183–203.
- 96) 松下智 (1978)、日本茶の伝来、八坂書房、東京、pp. 94–100.
- 97) Matsumoto, S., Takeuchi, A., Hayatsu, M., and Kondo, S. (1994) Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the PAL cDNA probe. *Theor. Appl. Genet.*, **89**(6), 671–675.
- 98) Matsumoto, S., Kiriiwa, Y., and Yamaguchi, S. (2004) The Korean tea plant (*Camellia sinensis*): RFLP analysis of genetic diversity and relationship to Japanese tea. *Breeding Sci.*, **54**(3), 231–237.
- 99) Prince, L. M. and Parks, C. R. (2001) Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from chloroplast DNA sequence data. *Am. J. Bot.*, **88**(12), 2309–2320.
- 100) Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y-L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Dennis Clark, W., Hedrén, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K-J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q-Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gedek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Goldenberg, E., Learn, Jr., G. H., Graham, S. W., Barrrett, S. C.

- H., Dayanandan, S., and Albert, V. A. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **80**(3), 528–580.
- 101) Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R. G., Anderberg, A. A., Källersjö., and Barkhordarian, E. (2002) Phylogenetics of asteroids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **24**(2), 274–301.
- 102) Inamura, A., Ohashi, Y., Sato, E., Yoda, Y., Masuzawa, T., Ito, M., and Yoshinaga, K. (2000) Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA reflecting variety and geographical distribution of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae) in Japan. *J. Plant Res.*, **113**(4), 419–426.
- 103) Yamane, K., Yasui, Y., and Ohnishi, O. (2003) Intraspecific cpDNA variations of diploid and tetraploid perennial buckwheat, *Fagopyrum cymosum* (Polygonaceae). *Am. J. Bot.*, **90**(3), 339–346.
- 104) Katoh, Y., Katoh, M., Takeda, Y., and Omori, M. (2003) Genetic diversity within cultivated tea based on nucleotide sequence comparison of ribosomal RNA maturase in chloroplast DNA. *Euphytica*, **134**(3), 287–295.
- 105) 田中淳一、太田さくら (1999)、茶の母性遺伝 RAPD の検出とそれを用いた細胞質の分類の可能性、*育種学研究*、別(1), 173.
- 106) Wight, W. and Barua, P. K. (1957) What is tea? *Nature*, **179**(4558), 506–507.
- 107) Wood, D. J. and Barua, P. K. (1958) Species hybrid of tea. *Nature*, **181**(4624), 1674–1675.

- 108) Wachira, F. N., Powell, W. and Waugh, R. (1997) An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* L. (cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified polymorphic DNA and organelle-specific STS. *Heredity*, **78**, 603–611.
- 109) Matsuda, Y., Yoshimura, H., Kanamoto, H., Ujihara, T., Tomizawa, K-I., Sugimura, Y., and Kitajima, S. (2005) Sequence variation in *rbcL-accD* region in the chloroplast genome of *Moraceae*. *Plant Biotechnol.*, **22**(3), 231–233.
- 110) Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22), 4673–4680.

謝辞

学位論文をとりまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学 生存圏研究所 矢崎一史教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、野菜茶業研究所 木幡勝則博士には茶品質化学研究室長としてご指導をいただき、また予算面でのご支援をいただきました。同じく堀江秀樹博士には、野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム長として、研究に集中できる環境を与えていただきました。同じく林 宣之博士には、日々の実験や論文作成について親身なご指導をいただきました。同じく松元 哲博士、Shiv Shankhar Kaundun 博士には、実験操作の基礎的なことからご親切に指導をいただきました。同じく水野直美博士、池田奈実子氏には、学位論文とりまとめ時にデータ解析についてご助言をいただきました。近畿中国四国農業研究センター 矢野 博博士には、予算面でのご支援を賜りました。皆様に心より感謝申し上げます。

本研究の共同研究者としてご協力、ご指導をいただきました、京都工芸繊維大学 北島佐紀人准教授、豊明会 松下 智氏、作物研究所 田中淳一博士、野菜茶業研究所 谷口郁也氏、太田隆介氏に心よりお礼を申し上げます。

また、京都大学生存圏研究所森林圏遺伝子統御分野の皆様には、様々なご協力をいただきました。末筆とはなりましたが、感謝を申し上げます。

発表論文リスト

- **Ujihara, T.**, Matsumoto, S., Hayashi, N., and Kohata, K.

Cultivar identification and analysis of the blended ratio of green tea production on the market using DNA markers. *Food Science and Technology Research*, **11**(1), 43-45 (2005).

- **Ujihara, T.**, Hayashi, N., Kohata, K., Matsushita, S., and Kitajima, S.

Intraspecific variation in the *rbcL-accD* region of the chloroplast genome in tea (*Camellia sinensis*). *Tea Research Journal*, **104**, 15-23 (2007).

- **Ujihara, T.**, Ohta, R., Hayashi, N., Kohata, K., and Tanaka, J.

Identification of Japanese and Chinese green tea cultivars by using simple sequence repeat markers to encourage proper labeling. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**(1), 15-20 (2009).

- **Ujihara, T.**, Taniguchi, F., Tanaka, J., and Hayashi, N.

Development of expressed sequence tag-based cleaved amplified polymorphic sequence markers of tea plant and their application to cultivar identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(5), 1557-1564 (2011).

- **Ujihara, T.**, Hayashi, N., and Tanaka, J.

Identification of material cultivar of green tea infusions by simple sequence repeat markers. *Food Science and Technology Research*, **18**(2), 209-217 (2012).